



UNIVERSIDAD DE LAS PALMAS DE GRAN CANARIA



TESIS DOCTORAL

**Conservación *ex situ* de *Cymodocea nodosa* (Ucria) Ascherson.
Propagación de semillas *in vitro* y establecimiento de cultivos
celulares**

Maite Zarranz Elso

LAS PALMAS DE GRAN CANARIA. NOVIEMBRE 2009



UNIVERSIDAD DE LAS PALMAS DE GRAN CANARIA



El Profesor Doctor D. Rafael Robaina Romero del Departamento de Biología de la Universidad de Las Palmas de Gran Canaria (España), y la Doctora Dña. M^a Nieves González Henríquez del Departamento de Gestión Litoral y Desarrollo Sostenible del Instituto Canario de Ciencias Marinas (Gran Canaria, España).

HACEN CONSTAR:

Que la MS Dña. Maite Zarranz Elso ha realizado el presente trabajo como Memoria de Tesis Doctoral bajo nuestra dirección, en el Departamento de Gestión Litoral y Desarrollo Sostenible del Instituto Canario de Ciencias Marinas y en el Departamento de Biología de la Universidad de Las Palmas de Gran Canaria, y se presenta con nuestro V^o B^o.

Fdo. Dr. Rafael Robaina Romero

Fdo. Dra. Nieves González Henríquez

Fdo. Maite Zarranz Elso



UNIVERSIDAD DE LAS PALMAS DE GRAN CANARIA

**D/D^a Juan Luis Gómez Pinchetti SECRETARIO DEL
DEPARTAMENTO DE Biología DE LA UNIVERSIDAD DE LAS
PALMAS DE GRAN CANARIA,**

CERTIFICA,

Que el Consejo de Doctores del Departamento en sesión extraordinaria tomó el acuerdo de dar el consentimiento para su tramitación, a la tesis doctoral titulada “Conservación *ex situ* de *Cymodocea nodosa* (Ucria) Ascherson. Propagación de semillas y cultivos celulares *in vitro*” presentada por el/la doctorando/a D/D^a. Maite Zarranz Elso y dirigida por el Dr. Rafael Robaina Romero y la Dra. Nieves González Henríquez

Y para que así conste, y a efectos de lo previsto en el Artº 73.2 del Reglamento de Estudios de Doctorado de esta Universidad, firmo la presente en Las Palmas de Gran Canaria, a 20 de Octubre de 2009

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar quiero agradecer a mi tutor, Rafael Robaina, el tiempo dedicado a mi enseñanza y a la elaboración de esta tesis. Por tu paciencia, tu optimismo y entusiasmo, que siempre me dieron el aliento necesario para seguir con ilusión. Agradecerte también la confianza que has tenido siempre en mí, por tu cercanía y amistad. Desde el principio fui consciente de la suerte que he tenido de poder trabajar contigo, por todo lo que he aprendido, porque eres una persona muy especial.

Quiero agradecer también a Nieves González, mi codirectora de tesis, que me abrió las puertas y me brindó su confianza desde el primer momento, permitiéndome trabajar con ella y descubriéndome un mundo que me apasiona. A Pili, por tu ayuda, dedicación y paciencia en el laboratorio, por tus consejos a la hora de corregir esta tesis, y por los momentos compartidos. A Eva y a Ancor, por vuestra ayuda indispensable en el laboratorio, por los cafés, y por los buenos ratos pasados.

Al Dr. Octavio Llinás, por escucharme y orientarme en mis comienzos. Al Gobierno de Canarias por concederme la beca de postgrado para la realización de esta tesis doctoral, y a la Universidad de las Palmas de Gran Canaria por la concesión de ayudas a congresos.

A mis filólogas favoritas, Carol y Elisa, por su ayuda imprescindible en la traducción de artículos. Al Dr. Mark Fonseca (NOAA) por la corrección y mejora de los artículos publicados. Al Dr. Kingsley Dixon por acogerme durante 3 meses en los laboratorios del Jardín Botánico de la ciudad de Perth (Australia) (Kings Park and Botanic Garden), y en especial al Dr. Eric Bunn por su asistencia y dedicación en el trabajo realizado durante mi estancia.

Por otra parte, agradecer a toda la gente del ICCM que me ha ayudado a lo largo de estos años, tanto a los compañeros como al personal del centro. Dado que el trabajo en el mar requiere siempre de compañía, he necesitado en cada muestreo de la ayuda de mis compañeros, sin la cual no habría podido realizar este trabajo. Por eso, muchas gracias a Pablo y a Juan, porque siempre estuvieron ahí desinteresadamente, os lo agradezco de verdad y espero poder ayudaros en un futuro. Y a todos los demás compañeros del ICCM, a Raúl, por estar siempre dispuesto a echar un cable, a Nayra, Lolo, Goro, Mónica, Macu y Oreto, por los buenos ratos pasados, los asaderos y las campañas que hemos disfrutados juntos.

No puedo olvidarme de mis amigos, y de toda la gente que ha pasado por mi vida en estos años tan lejos de mi tierra, a todos los que han convivido conmigo y me han enseñado distintas formas de ver la vida y han hecho más fácil y agradable mi estancia en la isla, a Pablito, Maria, Elisa, Carol, Camino, Api, Borja y Joanna. A mis amigas de Pamplona, y en especial a Egoi, por darme siempre el apoyo y el ánimo necesarios para seguir.

Por último quiero dedicar esta tesis a mis padres, hermanos y sobrinos, tan lejos estos años en la distancia pero siempre tan cerca en el corazón.

A lo largo del periodo de formación, la doctoranda ha publicado los siguientes trabajos en revistas internacionales:

Ruiz de la Rosa, M., García, N., Zarranz, M., Manent, P., Domínguez, R., Grimón, M., Louzara, G., González, N., **2006**. *Preliminary results of experimental evaluation about different methods of transplanting *Cymodocea nodosa* in the Canary Islands*. *Biologia Marina Mediterranea* 13 (4): 267-271.

Abstract The purpose of this study was to evaluate different transplanting methods and assess the practicality and costs of transplanting seagrasses over large, multi-hectare areas. The study was carried out on Tenerife Island, in a *Cymodocea nodosa* meadow threatened by expansion of harbour facilities. We evaluated four transplanting methods at a -12 m subtidal location: 1) sods of seagrass with the associated sediment and 2) biodegradable containers with small sods of seagrass inserted within, 3) sediment-free plants (shoots and rhizomes) entwined into a 3-ply line and inserted into the sediment, 4) sediment-free rhizomes entwined in a mesh fabric and attached to the bottom, all obtained from adjacent, undisturbed meadows. We calculated shoot density and planting unit survival over time and the amount of effort involved in each transplanting method and found that a substantial mortality of plants occurred within the first two months. After that time, vegetative shoot production exceeded losses and planting units expanded. We conclude that transplanted sods and biodegradable pots were the most cost-effective techniques of those tested and should be tested for larger scale restoration actions.

Zarranz Elso, M., González-Henríquez, N., García-Jiménez, P., Robaina, R.R., **2009**. *Restoration of *Cymodocea nodosa* (*Uchria*) Ascherson seagrass meadows through seed propagation. Germination in vitro, seedlings culture and field transplants*. *Botanica Marina* (Sometido)

Abstract *Cymodocea nodosa* is a marine angiosperm that forms ecologically relevant ecosystems in the Mediterranean Sea and the Northwest Atlantic Ocean; however, as other worldwide seagrasses ecosystems, these habitats are actually declining due to increasing human pressures. In that context, we have developed an effective propagation methodology that provides *C. nodosa* seedlings for seagrass meadow restoration and conservation. This method consists of: i) germination of wild collected seeds under hyposaline treatments, ii) acclimatisation of germinated seedling in tanks (1.6 m³) until they reach 2 shoots per seedlings (~30 days), and iii) transplantation of acclimated seedlings to the field in dense groups. Our plantings withstood herbivore activity and physical disturbance during winter season and undergone vegetative propagation resulting in the spreading and establishment of a new patch that has persisted for 9 months.

Zarranz Elso, M., González-Henríquez, N., García-Jiménez, P., Robaina, R.R., 2009. *Restoration of Cymodocea nodosa (Uchria) Ascherson seagrass prairies through seed propagation. Seed storage and growth of seedlings in vitro as affected by plant hormones and mineral nutrients.* Botanica Marina (Sometido)

Abstract Seed storage and the effects of plant growth regulators and fertilizers on in vitro germinated seedlings were evaluated as potential improvements for Cymodocea nodosa restoration purposes. Seeds stored in seawater at room temperature ($22 \pm 2^\circ\text{C}$) and 18°C enable retarding germinative potential for up to one year, though the best results were seen in the first six months. Seeds in water at 4°C or stored in dry conditions lost their germinative potential immediately. Gibberellic acid promoted shoot growth in seedlings, but most treatments with other auxins and cytokinins were not effective at achieving the desired growth effects. Treatments with added fertilizers only produced indirect effects on growth and development, perhaps as a consequence of the former. Seedlings appeared well nourished and most likely grew by utilising their abundant nutrient reserves.

Zarranz Elso, M., González-Henríquez, N., García-Jiménez, P., Robaina, R.R., 2009. *Axenic cell culture of the seagrass Cymodocea nodosa from cotyledonary tissue.* (En preparación).

Abstract A protocol has been developed to produce axenic cell cultures from Cymodocea nodosa cotyledonary tissue. The procedures have been optimized after several trials to eventually release enzymatically cells from the cotyledon. The cells grew and divided during months in axenic culture, increasing in 300% the number of cells after the first week of culture (from 15 ± 2 to 48 ± 7 cells per microscopic field), and forming cell aggregates with apparent morphogenetic potential. In addition, the meristematic zone in the cotyledon, source of such fast growing cells, has been located histologically. This way, we have generated a basic tool for the future of the C. nodosa in vitro culture, which allows the establishment and maintenance of cell cultures of a halophyte marine plant with high potential biotechnological applications.

Ha asistido como ponente a los siguientes congresos de carácter nacional e internacional:

Zarranz, M., Ruiz de la Rosa, M., Louzara, G., García-Jiménez, N., Grimón, M., González Henríquez, N., **2004**. *Caracterización de la pradera de Cymodocea nodosa (Ucria) Ascherson de Gran Tarajal, Fuerteventura*. **In:** XIII Simposio Ibérico de Estudios del Bentos Marino. Lorenzo, J.M., Pajuelo, J.G., Ramos, A., (Eds). Las Palmas de Gran Canaria, 21-24 de septiembre 2004.

Ruiz de la Rosa, M., Zarranz, M., Louzara, G., García, N., Grimón, M., Domínguez, R., González Henríquez, N., **2004**. *Variación espacial de invertebrados bentónicos asociados a praderas de Cymodocea nodosa (Ucria) Ascherson en Gran Tarajal, Fuerteventura*. **In:** XIII Simposio Ibérico de Estudios del Bentos Marino. Lorenzo, J.M., Pajuelo, J.G., Ramos, A., (Eds). Las Palmas de Gran Canaria, 21-24 de septiembre 2004.

Ruiz de la Rosa, M., García, N., Zarranz, M., Manent, P., Domínguez, R., Grimón, M., Louzara, G., González, N., **2006**. *Preliminary results of experimental evaluation of different methods of transplanting Cymodocea nodosa in the Canary Islands*. **In:** Proceeding of the Mediterranean Seagrass Workshop, 2006. Gambi, M.C., Borg, J., Buia M.C., Di Carlo, G. Pergent-Martini, C., Pergent, G., Procaccini, G., (Eds). Marsascala, Malta, May 29 – June 4 2006.

Zarranz Elso, M., González-Henríquez, N., García-Jiménez, P., Robaina, R.R., **2006**. *Inducción de la germinación y propagación in Vitro de semillas de Cymodocea nodosa*. **In:** XIV Simposio Ibérico de Estudios del Bentos Marino. Ballesteros, M., Palacín, C., Turon, X., (Eds). Barcelona, 11-15 de septiembre 2006.

Zarranz M., Manent P., Domínguez, R., Louzara, G., .González, N., **2006**. *Valoración ambiental de la zona afectada por un vertido de salmuera en el sureste de Gran Canaria*. **In:** XIV Simposio Ibérico de Estudios del Bentos Marino. Ballesteros, M., Palacín, C., Turon, X., (Eds). Barcelona, 11-15 de septiembre 2006.

Domínguez, R., Zarranz, M., Villares, P., **2006**. *Seguimiento de las poblaciones de Hippocampus hippocampus en las islas de Gran Canaria y Tenerife*. **In:** XIV Simposio Ibérico de Estudios del Bentos Marino. Ballesteros, M., Palacín, C., Turon, X., (Eds). Barcelona, 11-15 de septiembre 2006.

Ruiz de la Rosa, M., Louzara Fernández, G., García Jiménez, N., Zarranz Elso, M., González Henríquez, N., **2006**. *Efecto de las condiciones meteorológicas en una pradera de *Cymodocea nodosa* en las Islas Canarias*. **In:** XIV Simposio Ibérico de Estudios del Bentos Marino. Ballesteros, M., Palacín, C., Turon, X., (Eds). Barcelona, 11-15 de septiembre 2006.

Zarranz Elso, M., González-Henríquez, N., García-Jiménez, P., Robaina, R.R., **2007**. *Repoblando nuestras costas: propagación in vitro de la fanerógama marina *Cymodocea nodosa* (Cymodoceae)*. **In:** X Congreso Hispano-Luso de Fisiología Vegetal. XVII Reunión de la Sociedad Española de Fisiología Vegetal. Departamento de Congresos. Fundación General de la Universidad de Alcalá, (Ed). Alcalá de Henares. Madrid. 18-21 septiembre 2007.

Zarranz Elso, M., González-Henríquez, N., García-Jiménez, P., Robaina, R.R., **2008**. *Restoration of *Cymodocea nodosa* (Uchria) Ascherson seagrass prairies through seed propagation. Germination in vitro, plantlet acclimation and transplanting to natural meadows*. **In:** Proceedings of the 8th Internacional Seagrass Biology Workshop, Bamfield Canada 2008. Di Carlo, G., Calladine, A., Waycott, M., Carruthers, T., (Eds). Published by the World Seagrass Association, Townsville, Australia. August 2008.

Zarranz Elso, M., González-Henríquez, N., García-Jiménez, P., Robaina, R.R., **2008**. *Restoration of *Cymodocea nodosa* (Uchria) Ascherson seagrass prairies through seed propagation. Seed storage and growth of seedlings as affected by inorganic nutrients and plant hormones*. **In:** Proceedings of the 8th Internacional Seagrass Biology Workshop, Bamfield Canada 2008. Di Carlo, G., Calladine, A., Waycott, M., Carruthers, T., (Eds). Published by the World Seagrass Association, Townsville, Australia. August 2008.

Zarranz Elso, M., González-Henríquez, N., García-Jiménez, P., Robaina, R.R., **2009**. *Axenic cell culture of the seagrass *Cymodocea nodosa* from cotyledonary tissue*. **In:** Proceeding of the Mediterranean Seagrass Workshop 09. Di Carlo, G., Calladine, A., Zuljevic A. (Eds). Hvar, Croatia, September 6-10, 2009.

Ha recibido el premio internacional en Biología Marina por la comunicación:
Zarranz Elso, M., González-Henríquez, N., García-Jiménez, P., Robaina, R.R., **2008**. *Restoration of *Cymodocea nodosa* (Uchria) Ascherson seagrass prairies through seed propagation. Germination in vitro, plantlet acclimation and transplanting to natural meadows*. **In:** Proceedings of the 8th Internacional Seagrass Biology Workshop, Bamfield Canada 2008. Di Carlo, G., Calladine, A., Waycott, M., Carruthers, T., (Eds). Published by the World Seagrass Association, Townsville, Australia. August 2008.

La doctoranda ha participado, además, en la realización de los siguientes informes científicos:

Título del Proyecto: *Proyecto de restauración de los fondos de praderas de fanerógamas marinas asociados al acondicionamiento del puerto de Gran Tarajal, Fuerteventura.*

Organismo en el que lo realizó: Instituto Canario de Ciencias Marinas

Duración. 2003 - 2004

Responsable del Proyecto: Nieves González Henríquez

Título del Proyecto: *Proyecto piloto sobre la evaluación de las metodologías para la reubicación de la fanerógama marina *C. nodosa* de la zona costera de Granadilla (Tenerife).*

Organismo en el que lo realizó: Instituto Canario de Ciencias Marinas

Duración. Noviembre 2003-julio 2005

Responsable del Proyecto: Nieves González Henríquez

Título del Proyecto: *Redacción del Plan de Conservación de *Hippocampus sp* en Canarias.*

Organismo en el que lo realizó: Instituto Canario de Ciencias Marinas

Duración. Junio 2005-Octubre 2005

Responsable del Proyecto: Nieves González Henríquez

Título del Proyecto: *Cartografía y estudio de las comunidades bentónicas entre la Punta del Corral y Punta Tenefé. Mancomunidad del Sureste (Gran Canaria).*

Organismo en el que lo realizó: Instituto Canario de Ciencias Marinas

Duración. Junio 2005-Noviembre 2005

Responsable del Proyecto: Nieves González Henríquez

Título del Proyecto: *Valoración Ecológica de la zona del LIC de Mogán afectada por la construcción del puerto de Tauro (Gran Canaria).*

Organismo en el que lo realizó: Instituto Canario de Ciencias Marinas

Duración. Octubre-Noviembre 2005

Responsable del Proyecto: Nieves González Henríquez

Título del Proyecto: *Replante masivo del sebadal de Gran Tarajal (Fuerteventura)*

Organismo en el que lo realizó: Instituto Canario de Ciencias Marinas

Duración. 2005

Responsable del Proyecto: Nieves González Henríquez

Título del Proyecto: *Caracterización de la Baía da Murdeira en la Isla de Sal, Cabo Verde.*

Organismo en el que lo realizó: Instituto Canario de Ciencias Marinas

Duración. Junio 2005 – Junio 2007

Responsable del Proyecto: Nieves González Henríquez

Título del Proyecto: *Asistencia técnica para el estudio de plantación de sebaales.*

Organismo en el que lo realizó: Instituto Canario de Ciencias Marinas

Duración. 2006-2009

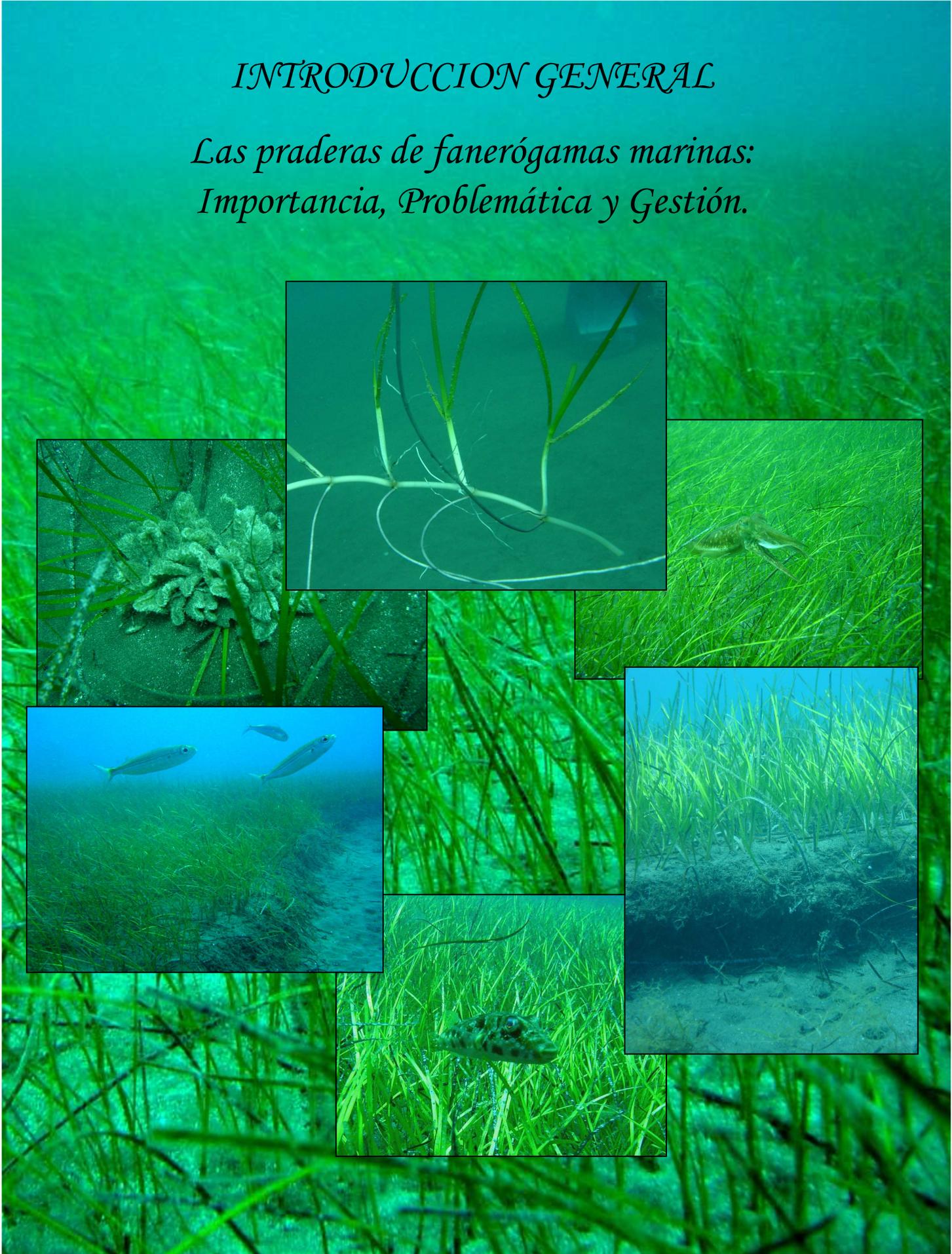
Responsable del Proyecto: Nieves González Henríquez

I.G.	INTRODUCCIÓN GENERAL. <i>Las praderas de fanerógamas marinas: Importancia, Problemática y Gestión</i>.....	1
	I.G. 1. Introducción General.....	1
	I.G. 2. Objetivo General.....	15
	I.G. 3. Bibliografía Introducción General.....	16
I.	CAPÍTULO I. <i>Propagación in vitro de semillas de Cymodocea nodosa como técnica de restauración ex situ</i>.....	24
	I. 1. Introducción.....	24
	I. 2. Objetivos.....	37
	I. 3. Material y Métodos.....	38
	I. 4. Resultados.....	51
	I. 5. Discusión.....	63
	I. 6. Conclusión.....	83
	I. 7. Bibliografía.....	87
	I. 8. Anexo. Figuras.....	97
II.	CAPÍTULO II. <i>Optimización de la técnica de propagación desarrollada: Conservación de semillas y alteración de los patrones de crecimiento vegetal con reguladores del crecimiento y nutrientes</i>.....	122
	II. 1. Introducción.....	122
	II. 2. Objetivos.....	137
	II. 3. Material y Métodos.....	138
	II. 4. Resultados.....	144
	II. 5. Discusión.....	149
	II. 6. Conclusión.....	177
	II. 7. Bibliografía.....	179
	II. 8. Anexo. Figuras.....	191

III. CAPITULO III. <i>Cultivo in vitro de Cymodocea nodosa a partir de tejido embrionario</i>.....	197
III. 1. Introducción.....	197
III. 2. Objetivos.....	221
III. 3. Material y Métodos.....	222
III. 4. Resultados	235
III. 5. Discusión.....	242
III. 6. Conclusión.....	255
III. 7. Bibliografía.....	256
III. 8. Anexo. Figuras.....	270

INTRODUCCION GENERAL

*Las praderas de fanerógamas marinas:
Importancia, Problemática y Gestión.*



ÍNDICE INTRODUCCIÓN GENERAL

I.G.1. Introducción General.....	1
I.G.1.1. Distribución mundial de las fanerógamas marinas.....	1
I.G.1.2. Importancia del hábitat y sus repercusiones.....	3
I.G.1.3. Regresión de praderas de fanerógamas marinas.....	4
I.G.1.4. Estrategias de conservación:	
a) Elaboración de planes y leyes para la protección.	7
b) Programas de rehabilitación, restauración y mitigación.....	8
I.G.1.5. Métodos empleados para la restauración de praderas.....	10
I.G.2. Objetivo General.....	15
I.G.3. Bibliografía Introducción General.....	16

I.G.1. INTRODUCCIÓN GENERAL



I.G.1.1. *Las fanerógamas marinas se distribuyen a lo largo de todo el mundo, estando presentes tres especies en las Islas Canarias.*

Las fanerógamas marinas son angiospermas acuáticas que pertenecen a la división Magnoliophyta y a la clase Liliopsida (monocotiledóneas) (Kuo & den Hartog, 2001). Proviene evolutivamente de ancestros terrestres y están presentes en todas las regiones de la Tierra excepto en la Antártida (Kuo & den Hartog, 2006). Estos autores reconocen un total de 4 familias, 64 especies y 12 géneros, tal y como representamos en la Fig. I.G.1, e incluyen en su descripción taxonómica a dos especies de plantas acuáticas por su relación con el ambiente marino: *Ruppia tuberosa* (Ruppiaceae) y *Lepilaena marina* (Zannichelliaceae), aunque la inclusión de estos dos géneros sigue siendo materia de debate. De los 12 géneros típicamente reconocidos como fanerógamas marinas o *seagrasses*, 7 se distribuyen por las costas tropicales (*Thalassia*, *Halophila*, *Syringodium*, *Halodule*, *Cymodocea*, *Thalassodendron* y *Enhalus*), mientras que 5 son de aguas más templadas (*Zostera*, *Phyllospadix*, *Heterozostera*, *Posidonia* y *Amphibolis*) (Kuo & den Hartog, 2006). Sin embargo, las fronteras no están claramente definidas, ya que las especies *Cymodocea*, *Halophila* y *Thalassodendron* se extienden también por climas templados, y las especies *Zostera* y *Posidonia* presentan una distribución bipolar, distribuyéndose tanto en el hemisferio sur como en el norte (Kuo & den Hartog, 2006).

Estas especies forman praderas submarinas, generalmente en fondos arenosos bien iluminados, extendiéndose desde la orilla hasta los 40 metros de profundidad. En las Islas Canarias se encuentran tres especies: *Cymodocea nodosa*, *Halophila decipiens* y *Zostera noltii* (Afonso Carrillo & Gil Rodríguez, 1980; Gil Rodríguez & Cruz Simó, 1982; Gil Rodríguez *et al.*, 1987; Afonso Carrillo & Sansón, 1999; Haroun *et al.*, 2002), distribuidas principalmente por las costas protegidas de la vertiente sur y este del archipiélago (Pavón-Salas *et al.*, 2000). De las tres, *C. nodosa* es la especie dominante (Afonso Carrillo & Gil Rodríguez, 1980; Reyes *et al.*, 1995), formando praderas densas entre los 2 y los 35 metros de profundidad (Pavón-Salas *et al.*, 2000), mientras que *H. decipiens* forma praderas más laxas, localizadas y profundas, entre los 6 y los 40 metros de profundidad (Gil Rodríguez & Cruz Simó, 1982, Pavón-Salas *et al.*, 2000). La presencia de *Z. noltii* se confirmó en 1987 en las costas de Lanzarote, por Gil Rodríguez *et al.*, quienes observaron que esta especie formaba praderas densas, que permanecían parcialmente emergidas en bajamar, y se extendían hasta los 1.5 metros de profundidad.

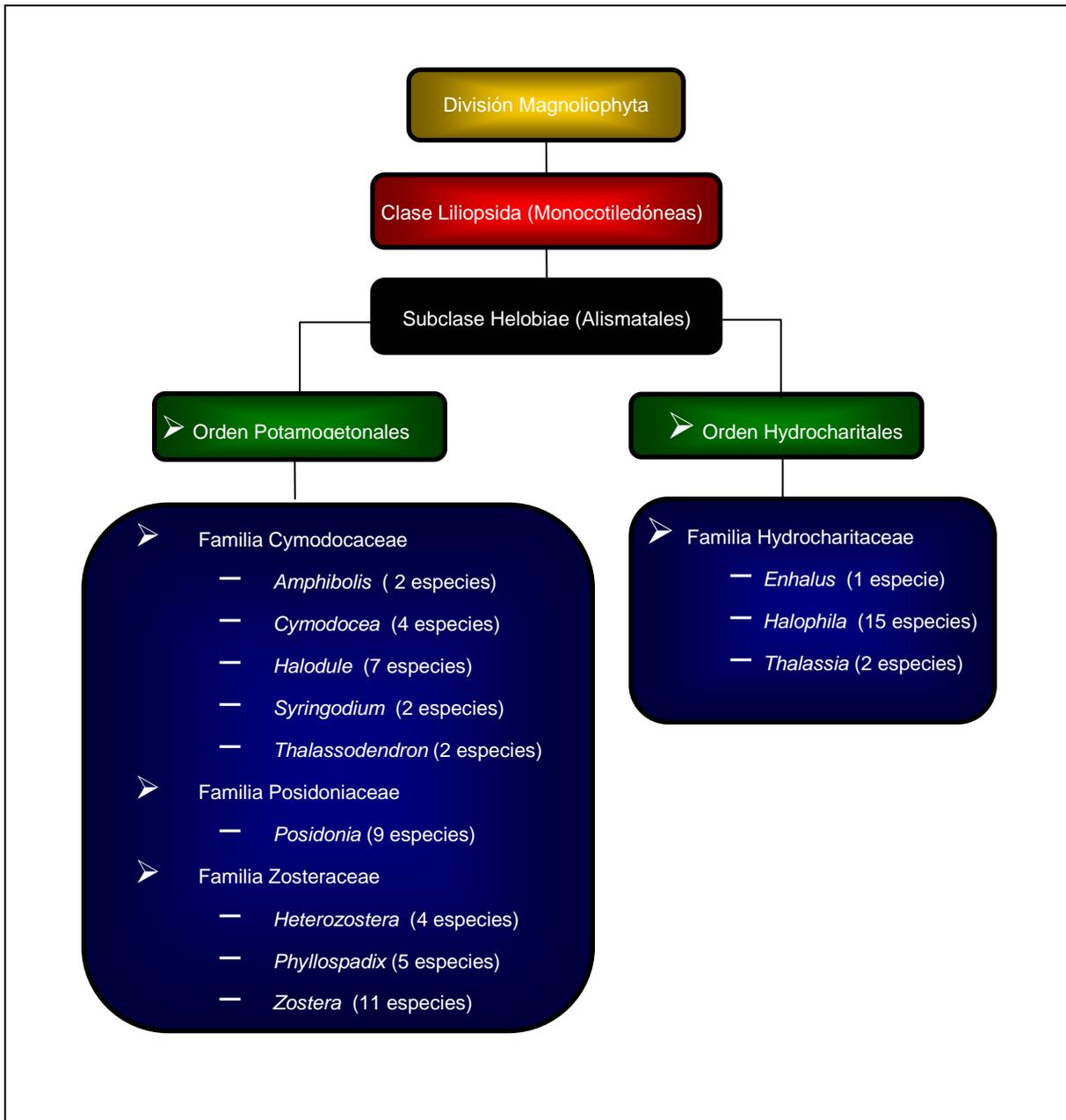


Fig. I.G.1. Clasificación taxonómica de las fanerógamas marinas (basado en Kuo & den Hartog, 2001, 2006).

I.G.1.2. El hábitat que forman las praderas de fanerógamas marinas tiene una importante función ecológica de la que se derivan importantes repercusiones económicas.

Las praderas de fanerógamas marinas juegan un importante papel ecológico en los ecosistemas costeros de todo el mundo, además de incrementar la riqueza, abundancia y biomasa de especies en comparación a substratos sin vegetación (Orth *et al.*, 2006). Esto es debido a que la estructura tridimensional de la planta aumenta el espacio habitable, y proporciona la protección y el substrato necesario para la existencia de una gran variedad de plantas y animales que no podrían vivir en fondos sin vegetación (Mena *et al.*, 1993; Terrados & Borum, 2004; Orth *et al.*, 2006). Así mismo, las hojas, los rizomas y las raíces de estas plantas son utilizados por muchas especies de interés pesquero como zonas de puesta y desarrollo de los juveniles (Mena *et al.*, 1993; Orth *et al.*, 2006). En consecuencia, la biodiversidad y la densidad de la flora y la fauna en las praderas es mucho más elevada que en áreas adyacentes sin vegetación (Terrados & Borum, 2004; Orth *et al.*, 2006).

Paralelamente, debido a que estos hábitats albergan una gran diversidad de organismos, las praderas se consideran fuente de nuevo sedimento. Las partículas orgánicas son las componentes principales del sedimento en las costas, por lo que, en muchas zonas, las partículas producidas en las praderas pueden contribuir notablemente a alimentar las playas, además de reducir la erosión de las costas (Terrados & Borum, 2004). Por lo tanto, el mantenimiento y conservación de estos ecosistemas puede servir como estrategia de gestión para preservar y mejorar la calidad ambiental de las zonas costeras (Terrados & Borum, 2004).

Por otro lado, la cantidad de alimento disponible en estos hábitats es varios órdenes de magnitud mayor en comparación con otros ambientes. Estas praderas son fuente de alimentación para algunos herbívoros grandes como las tortugas, los dugons y los manatíes, y proporcionan grandes cantidades de carbón, parte del cual es exportando a las profundidades marinas y supone un importante aporte de materia orgánica en estos ambientes tan limitados (Orth *et al.*, 2006). Las fanerógamas marinas presentan, además, altas tasas de producción primaria (Terrados & Borum, 2004), a lo que hay que sumar la alta productividad de los epífitos algales. Igualmente, la producción primaria de todo el sistema se ve favorecida con la captura de partículas orgánicas y nutrientes

presentes en el agua y sedimentos, ya que estos vegetales funcionan a modo de filtros con capacidad para controlar la transparencia del agua (Terrados & Borum, 2004).

Así mismo, estas especies pueden considerarse como centinelas biológicos (Orth *et al.*, 2006), ya que al ser individuos sésiles son capaces de integrar aspectos de la calidad del agua. Debido a la sensibilidad que presentan las praderas a determinados estreses y al servicio ecológico que prestan, las fanerógamas marinas son uno de los 5 indicadores de contaminación en la US National Estuarine Eutrophication Assessment (Orth *et al.*, 2006).

Por otra parte, gracias a la densidad de hojas y a la red de rizomas y raíces, las praderas submarinas influyen en las características del ambiente, reduciendo la velocidad de las corrientes e incrementando la deposición de partículas, el asentamiento larvario y la estabilidad del sedimento (Fonseca & Cahalan, 1992). Impiden así que se produzcan grandes desplazamientos, lo que permite preservar la flora microbiana que vive en el sedimento y reducir la erosión de las costas (Terrados & Borum, 2004).

Por último, las fanerógamas marinas han servido al hombre tradicionalmente en diferentes usos, empleándolas, por ejemplo, como material de embalaje o para fabricar adobes, aislantes, construir diques o alimentar al ganado (Terrados & Borum, 2004).

I.G.1.3. La monitorización y el estudio de las praderas de fanerógamas marinas revelan que existen síntomas de regresión.

La franja del litoral ocupada por las fanerógamas marinas coincide con las zonas de mayor presión antrópica, por lo que, a pesar de tener una importante función ecológica, están sometidas a numerosos impactos ambientales (Orth *et al.*, 2006). Así, estudios recientes revelan que el 15 % de las especies de fanerógamas marinas se encuentran amenazadas, al igual que un gran número de especies asociadas a ellas (~ n = 70) (Hughes *et al.*, 2009). Globalmente, se estima que la pérdida de estos ecosistemas en las últimas dos décadas es del 18 % de toda el área documentada (Duarte *et al.*, 2004), estimándose ratios anuales de pérdida de entre un 2 y un 5 % (Duarte & Gattuso 2008). En Australia, por ejemplo, se han perdido 45000 ha de praderas de fanerógamas marinas (Walker & McComb, 1992; Hamdorf & Kirkman, 1995). En Tampa Bay (Florida, EEUU), de 31000 ha de praderas existentes en los años 30 han pasado a 8800 en 1982 (Johansson & Greening, 2000). La principal causa de esta regresión,

independientemente de las perturbaciones naturales, son las actividades humanas, como pueden ser los vertidos provocados por accidentes navales o ligados a los asentamientos humanos e industriales en el litoral, el anclaje de embarcaciones, la pesca de arrastre, la acuicultura, o la alteración del hábitat relacionada con las construcciones costeras (puertos comerciales, industriales y deportivos, diques de abrigo, playas artificiales, emisarios submarinos...) (Sánchez-Jerez, 1994; Duarte *et al.*, 2004; Fernández Torquemada & Sánchez Lizaso, 2006; Erftemeijer, 2006).

De todos los impactos humanos, la eutrofización es, según varios autores, el que más afecta a los vegetales marinos (Johansson & Greening, 2000; Ralph *et al.*, 2006). El exceso de nutrientes tiene un efecto tóxico y favorece el crecimiento de fitoplancton y macroalgas epífitas de ciclos de vida muy cortos, que en último término bloquean la penetración de la luz hasta las hojas (Ralph *et al.*, 2006). Entre las décadas de los años 60 y 80, varias especies sufrieron un fuerte declive debido a la eutrofización, entre ellas *Posidonia* spp. y *Amphibolis* spp. en Australia, *Posidonia oceanica* en Europa (Ralph *et al.*, 2006 y referencias contenidas en este artículo) y *Thalassia testudinum* en EEUU (Johansson & Greening, 2000). El desarrollo urbanístico trajo consigo también una serie de contaminantes antropogénicos que afectaban a las praderas, entre los que destacan los metales pesados, los herbicidas, los pesticidas y los compuestos petroquímicos (Ralph *et al.*, 2006).

En el Archipiélago Canario, el desarrollo urbanístico experimentado durante los últimos años ha sometido al litoral de las islas a una desmesurada presión antrópica, provocando el deterioro de algunas praderas y la desaparición de otras. Observamos, tras revisar la bibliografía, una regresión de las praderas de *Cymodocea nodosa*, siendo más problemática aún la desaparición de la especie *Zostera noltii* de las costas canarias. Pavón-Salas *et al.*, en el año 2000, no encontraron ninguna localización de *Z. noltii* en las costas de Lanzarote donde se distribuía antiguamente (según el estudio de Gil Rodríguez *et al.*, 1987 sobre la distribución de *Z. noltii* en las Islas Canarias), siendo la última cita conocida sobre la existencia de esta especie de Guadalupe *et al.* (1995). Estos autores realizan sus últimos muestreos en 1992, y ya mencionan que la presencia de *Z. noltii* ha quedado restringida a manchas puntuales con escasísimos ejemplares. Para esta especie, su escasa distribución inicial y el hecho de ocupar la franja intermareal del litoral, le ha provocado una mayor sensibilidad a los impactos humanos y una menor capacidad de amortiguación.

Para la especie *Halophila decipiens* existen menos estudios sobre su distribución actual en las Islas Canarias, y únicamente los autores Pavón-Salas *et al.* (2000) localizaron varias praderas en la costa este y sureste de Tenerife, una en Gran Canaria y otra en la Palma. Por otra parte, es probable que estas praderas estén menos afectadas por la contaminación y las actividades humanas debido a que ocupan una franja costera de mayor profundidad.

En el caso de *Cymodocea nodosa*, hay datos sobre su presencia en determinadas áreas donde actualmente no existen o se observan praderas escasamente distribuidas. Es el caso de la presencia de esta especie en la playa de las Canteras, en la isla de Gran Canaria. Varios autores (Afonso Carrillo & Gil Rodríguez, 1980; Pavón-Salas *et al.*, 1998, 2000; y González, 1976, como *Zostera marina*) citan su presencia en esta playa formando praderas relativamente compactas entre los 1.5 y los 5 metros de profundidad. González (1980) observa incluso flores masculinas, lo cual es un indicativo de la salud que mantenían estas praderas en la época. Actualmente, ha desaparecido casi por completo de esta zona, debido posiblemente a los distintos factores humanos que la han afectado en las últimas décadas, como la misma construcción de la ciudad de Las Palmas sobre el istmo de la Isleta, que ha impedido la libre circulación de arena favoreciendo la deposición y el enterramiento de la pradera. Otro ejemplo documentado es la regresión de la pradera de *Cymodocea nodosa* de la bahía de Melenara, la cual, tras la instalación de jaulas de acuicultura en 1999, disminuyó significativamente el número de haces m⁻², la altura de los haces y el % de cobertura x 100 m² tras dos años de seguimiento (Vergara Martín *et al.*, 2005). Además, conforme esta pradera se fue degradando, los peces asociados a ella desaparecieron (Vergara Martín *et al.*, 2005). Otras praderas del Archipiélago Canario se encuentran aparentemente en regresión, aunque no existen estudios exhaustivos sobre su estado de conservación actual.

Las evidencias mencionadas de regresión de praderas o de desaparición de especies de fanerógamas marinas en las Islas Canarias, demuestran la fragilidad de estos ecosistemas frente a los impactos humanos y la necesidad de protección de todas las praderas presentes en el Archipiélago.

I.G.1.4. *El deterioro de las praderas exige la adopción de diferentes estrategias de conservación, entre ellas:*

a) La elaboración de planes y leyes para la protección.

Como medidas de protección deben adoptarse leyes que protejan específicamente las praderas de fanerógamas, leyes que regulen las actividades que las afectan, o leyes que promuevan la protección de las áreas donde crecen, con la delimitación de reservas marinas o con la instalación de arrecifes artificiales para evitar la pesca de arrastre. Entendemos que se deben llevar a cabo programas de conservación, donde participen de forma activa tanto la comunidad científica como los ciudadanos. Siguiendo el modelo aplicado en Tampa Bay (Florida), por ejemplo, mediante la adopción de estrategias para la evaluación y el control de la calidad de las aguas (niveles de carga de nitrógeno al sistema basados en los requerimiento de luz de *Thalassia testudinum*), se ha superado la tendencia a la regresión de las praderas, pasando de 8.800 ha en 1982 a 10.930 ha en 1997 (Johansson & Greening, 2000).

En el caso de *Cymodocea nodosa*, el hábitat constituido por esta especie se encuentra protegido por la UE dentro de la Directiva Hábitats (Directiva 92/43/CEE del Consejo, de 21 de mayo de 1992), relativa a la conservación de los hábitats naturales y de la fauna y flora silvestres, con el código 1110. Las zonas costeras que albergan estos hábitats pasan a formar parte de la Red Natura 2000 con la denominación de Lugares de Importancia Comunitaria (LIC's) y posteriormente como Zonas de Especial Conservación (ZEC). A nivel autonómico, *C. nodosa* está incluida en el Catálogo de Especies Amenazadas de Canarias, regulado por el decreto 151/2001, como “sensible a la alteración del hábitat”. Cualquier actuación que cause una regresión, degradación o destrucción de estas praderas puede considerarse una agresión medioambiental grave.

En 2003, debido a la grave situación en la que se encontraban las fanerógamas marinas en Canarias, se redactó el Plan de Conservación del hábitat de *Cymodocea nodosa* como posible solución a estas afecciones. En este Plan se recogieron las medidas y actuaciones específicas que deben llevarse a cabo para conservar de manera favorable las poblaciones de *C. nodosa* que se encuentran en regresión o que pueden ser afectadas irremediablemente por actuaciones en el litoral. El Plan aborda tres tipos de ámbitos, el relacionado con la especie (estudios genéticos, cultivo *in vitro*, trasplantes...), el relacionado con el ecosistema (determinar el estado de conservación

de las praderas, hacer cumplir la legislación vigente, estudios de impacto ambiental....), y por último el ámbito social (con programas de divulgación y concienciación, canales de comunicación....). Por el momento, el Plan de Conservación del hábitat de *C. nodosa* en Canarias se encuentra pendiente de aprobación por las autoridades competentes.

b) La conservación mediante actuaciones *in situ* y *ex situ*: programas de rehabilitación, restauración y mitigación.

En primer lugar es conveniente hacer una definición de los diferentes términos empleados en este sentido: rehabilitación, restauración y mitigación. La rehabilitación de praderas de fanerógamas marinas es un término general, que implica el retorno de praderas en zonas donde existían previamente (no implica necesariamente a la misma especie ni el funcionamiento del ecosistema) (Seddon, 2004). El término restauración hace referencia al retorno de las praderas hasta las condiciones preexistentes. En esta ocasión sí implica a la misma especie, abundancia, distribución y funciones del ecosistema (Seddon, 2004). Se entiende por mitigación las actuaciones llevadas a cabo para contrarrestar o minimizar los impactos y compensar la pérdida o degradación de praderas de fanerógamas marinas (Lord *et al.*, 1999).

Según Fonseca *et al.* (1998), existen 5 objetivos principales que deben alcanzarse en un proyecto de mitigación o restauración de fanerógamas marinas:

- 1º. Desarrollar una cubierta vegetal estable.
- 2º. Trasplantar un área vegetal equivalente a la perdida.
- 3º. Aumentar el área trasplantada lo máximo posible.
- 4º. Reemplazar la misma especie que se ha perdido.
- 5º. Desarrollar una fauna estable y equivalente a la natural en la pradera control.

A nivel global, llevan realizándose actuaciones en praderas de fanerógamas marinas degradadas por la actuación humana desde la segunda mitad del siglo XX, con el fin de mejorar las condiciones ecológicas de las mismas (Addy, 1947; Phillips, 1974, 1980, 1990; Fonseca *et al.*, 1998; Gordon, 1996; Johansson & Greening, 2000). Se han llevado a cabo diferentes experimentos de restauración y mitigación con diferentes grados de éxito en Norte y Centro América (Thorhaug, 1983, 1985; Davis & Short, 1997; Sheridan *et al.*, 1998; Harwell & Orth, 1999, Fonseca *et al.*, 1994; 1998; 2003; Orth *et al.*, 1999; Heidelbaugh *et al.*, 2000; Herrera-Silveira *et al.*, 2000), Australia (Lord *et al.*, 1999; Paling *et al.*, 2000, 2001, 2007; van Keulen *et al.*, 2003), Japón

(Watanabe & Terawaki, 1986) y Europa: Dinamarca (Christensen *et al.*, 1995), Holanda (van Katwijk, 2003), Italia (Balestri *et al.*, 1998; Piazzini *et al.*, 1998; Curiel *et al.*, 2003), España (Ruiz de la Rosa *et al.*, 2006) o Francia (Meinesz *et al.*, 1993; Molenaar *et al.*, 1993; Molenaar & Meinesz, 1995).

Los primeros intentos de trasplante se realizaron en el mar de Wadden con la especie *Zostera marina*, tras las catastróficas pérdidas sufridas a comienzos de siglo XX (den Hartog, 1996; van Katwijk, 2003). Debido a esto, *Z. marina* es una de las especies más estudiadas, llevándose a cabo proyectos para la restauración de sus praderas y la reintroducción en zonas donde existía antiguamente (Davis & Short, 1997; Harwell & Orth, 1999; Orth *et al.*, 1999; van Katwijk, 2003). Junto con *Zostera*, las especies *Thalassia testudinum*, *Halodule wrightii* y *Syringodium filiforme*, han sido objetivo de programas de restauración en EEUU (Addy, 1947; Fuss & Nelly, 1969; Phillips, 1974; Thorhaug, 1983, 1985). En el Mediterráneo, el mayor esfuerzo se ha realizado con *Posidonia oceanica*, intentando su recuperación de forma artificial en zonas degradadas por el efecto de la pesca de arrastre o la contaminación (Cooper, 1982; Meinesz *et al.*, 1993; Molenaar *et al.*, 1993; Balestri *et al.*, 1998; Lepoint *et al.*, 2004). Con *Posidonia* se han alcanzado altas tasas de supervivencia después de tres años del trasplante de rizomas plagiótropos (Meinesz *et al.*, 1993; Molenaar & Meinesz, 1995; Piazzini *et al.*, 1998; Procaccini & Piazzini, 2001).

El éxito de los proyectos de restauración y mitigación a lo largo de todo el mundo se establece alrededor del 30% (Fonseca *et al.*, 1998), aunque en algunas regiones se han recogido índices mayores. El éxito de los trasplantes va a depender de muchos factores, por una parte de la propia especie y sus requerimientos ambientales, y por otra de los métodos de trasplante empleados, del lugar y de la época de trasplante.

Según Gordon (1996), existen una serie de consideraciones que deben ser tenidas en cuenta a la hora de restaurar, rehabilitar o crear una pradera:

- 1°. Seleccionar sitios favorables para el trasplante (en cuanto a calidad de agua, estabilidad del sedimento...).
- 2°. Desarrollar una metodología que se adapte a las condiciones del lugar.
- 3°. Incrementar y mejorar las tasas de crecimiento y cobertura de la pradera.
- 4°. Minimizar el impacto en las praderas donantes.
- 5°. Tener en cuenta el tiempo y dinero consumidos.
- 6°. Conseguir reemplazar las funciones ecológicas naturales de la pradera.

I.G.1.5. *Los métodos empleados para la restauración de praderas son muy heterogéneos, y varían en función de la especie y de las condiciones hidrodinámicas del entorno.*

De forma general se pueden diferenciar los métodos de trasplante manuales y los mecánicos. Los **métodos manuales** se basan, por una parte, en la recolección de semillas de la pradera donante para dispersarlas directamente (Thorhaug, 1985; Orth *et al.*, 1994; Harwell & Orth, 1999; Pickerell *et al.*, 2005), o para hacerlas germinar y trasplantar las plántulas a la pradera receptora (Cooper, 1982; Meinesz *et al.*, 1993; Balestri *et al.*, 1998; Kirkman, 1998); o, por otra parte, en la recogida de fragmentos de rizoma o *ramets* de una pradera donante, libres o con sedimento, y su trasplante a la pradera receptora con diferentes formas de anclaje. Así se denominan y definen algunos de los métodos basados en la recolección de rizomas:

- *Plugs, sods, cores* o *peat pot*: consistentes en fragmentos de rizoma con sedimento intacto y extraídos con *cores* o palas (Thorhaug, 1985; Heidelbaugh *et al.*, 2000; van Keulen *et al.*, 2003; Curiel *et al.*, 2003; Seddon, 2004; Ruiz de la Rosa *et al.*, 2006; Paling *et al.*, 2007).

- *Sprigs*: son fragmentos de rizoma libres de sedimento (Thorhaug, 1985; Paling *et al.*, 2007).

- *Staple*: método consistente en un rizoma con dos haces, libre de sedimento, y fijado al fondo con una grapa de metal (van Keulen *et al.*, 2003; Curiel *et al.*, 2003; Park & Lee, 2007) o de material biodegradable (Davis & Short, 1997).

- *Terfs* o *mesh*: haces libres de sedimento y fijados en una estructura de red metálica (Ruiz de la Rosa *et al.*, 2006; Park & Lee, 2007) o de material biodegradable (Lepoint *et al.*, 2004).

- *Shell method* o método de la concha: que consiste en un rizoma y dos haces, libres de sedimento, unidos a una concha, y en el cual, según el autor, no es necesario el trabajo de buceadores (Park & Lee, 2007).

En general se han llevado a cabo numerosos proyectos de restauración a pequeña escala (<1 ha) con métodos manuales, aunque ha aumentado el interés en programas de trasplante a mayor escala (Fonseca *et al.*, 1998). Ya en 1982 comenzó un proyecto de restauración a gran escala en la Bahía de Biscayne, Florida, abarcando una superficie de

4.20 ha (Thorhaug, 1985). Se trasplantaron tres especies de *seagrasses*, *Thalassia testudinum*, *Halodule wrightii* y *Syringodium filiforme* mediante 2 métodos manuales, *sprigs* y *plugs*, obteniéndose los mejores resultados en los *sprigs* de *Thalassia* con un 70% de supervivencia 18 meses después del trasplante. Davis & Short (1997), trasplantaron 2.52 hectáreas de *Zostera marina* para mitigar el impacto de la expansión de un puerto en una pradera ya existente. Para ello emplearon una nueva técnica con rizomas horizontales, reduciendo en un 80% el número de plantas requeridas de la pradera donante, y disminuyendo así su impacto. Un año después del trasplante los índices de supervivencia rondaron el 75-98%. En 1996, en Chesapeake Bay (EEUU), comenzó un proyecto de restauración a gran escala empleando una técnica más simple que las utilizadas hasta ese momento, la cual consistió en trasplantar haces individuales sin anclar y sin protección, plantados en ángulo, reduciendo así el tiempo de trasplante (Orth *et al.*, 1999). Los haces individuales se establecieron satisfactoriamente y mostraron un crecimiento rápido durante los 20 primeros meses. Esta técnica de haces individuales reducía en un 50% el número de plantas mencionadas en el trabajo de Davis & Short (1997).

La bibliografía revisada revela, además, que las experiencias de trasplante con métodos manuales han tenido menos éxito en Australia que en EEUU, debido probablemente a que en Norte América las fanerógamas marinas se dan en estuarios o costas con bajo hidrodinamismo, mientras que en Australia ocupan hábitats más expuestos al oleaje (Paling *et al.*, 2000). Kirkman (1998) y Van Keulen (2003), llevaron a cabo sin éxito varios experimentos de trasplante en las costas australianas, debido a que los sistemas de anclaje no eran suficientes para mantener las plantas en el sedimento. Más recientemente, también en Australia, Paling *et al.*, (2007) consiguieron mejorar los resultados anteriores mediante el empleo de dos métodos de trasplante manuales (*plugs* y *sprigs*) con la especie *Posidonia sinuosa*, trabajando a 3 profundidades (3, 5 y 9 m) y en 7 localidades distintas. El método de los *plugs* se consideró como el más favorable, ya que mostró mayores porcentajes de supervivencia dos años después del trasplante, en los diferentes sitios y condiciones. Por otro lado, los *sprigs* fueron menos costosos que los *plugs*, y tuvieron mayores porcentajes en aguas poco profundas con sedimento fino, movimiento moderado del agua y máxima luz disponible. Park & Lee (2007), en Corea, emplearon 3 técnicas de trasplante con *Zostera marina* en varios sitios y con diferentes tipos de sedimentos. El método *staple* obtuvo la mayor supervivencia (77.1-93.8%) en los tres sitios, pero resultó más costoso

laboralmente. El método de los *terfs*, en donde fijaron 72 haces en una estructura metálica de 60 x 60 cm para obtener una densidad de 200 haces m⁻², también dio buenos resultados (58.7-69%) en todos los sitios. Estos autores emplearon también el método de la concha con muy buenos resultados en sedimentos fangosos (81.3%) y limosos (76.5%), pero muy bajos porcentajes en sedimentos arenosos (5%). Los *terfs* y las conchas redujeron el tiempo de trabajo bajo el agua, por lo que, según los autores, son adecuados para restauraciones a gran escala.

La restauración de praderas recogiendo rizomas de la pradera donante y plantando en sitios nuevos, como ya hemos visto, no siempre ha dado buenos resultados, además de ser una labor bastante cara. Orth *et al.* (2006) sugirieron que las praderas creadas con fragmentos de rizoma trasplantados tendían a ser genéticamente más homogéneas, crecían más despacio, producían menos semillas y tenían menores índices de germinación que las praderas más diversas genéticamente. Procaccini & Piazzini (2001) sugirieron que la variabilidad genética del material de partida era importante para el éxito de la restauración de praderas degradadas. La variabilidad genética se ve aumentada por la reproducción sexual; por lo tanto, las plántulas germinadas a partir de semillas pueden ser una fuente de material óptima para el trasplante (Williams & Orth, 1998). Es por esto que **cada vez hay mayor interés en usar semillas como método alternativo para la restauración de hábitats degradados**. Estas técnicas tienen la ventaja de que el impacto en la pradera donante es menor, y el trabajo con semillas es menos laborioso (Christensen *et al.*, 2004). Recientemente, los proyectos de restauración de praderas de fanerógamas marinas se centran también en las metodologías que favorecen el proceso de recolonización natural, denominadas *compressed succession* (Fonseca *et al.*, 2000). En ellas se favorece el crecimiento de especies colonizadoras de rápido crecimiento (como *Halodule wrightii*), y se planta entre ellas la especie clímax (por ejemplo *Thalassia testudinum* o *Posidonia* sp.), tanto con plántulas recolectadas como cultivadas. En este sentido, los resultados de van Keulen *et al.*, (2003) indicaron que los *cores* de *Posidonia* crecían mejor cuando se plantaban en medio de una pradera de *Heterozostera*, comparado con sedimentos desnudos o en sedimentos desnudos con alguna protección.

La **técnicas mecánicas** fueron implantadas en las costas de EEUU a partir de 1997 (Ehringer & Anderson, 2002), cuando James Anderson construyó un barco con un sistema de inyección de nutrientes en el sedimento. En 1998, James Anderson ideó otro

barco para sembrar haces de *Halodule wrightii* y plántulas de *Thalassia testudinum* crecidas a partir de semillas, con el que era posible plantar más de un acre por día (4.046 m²). Más recientemente, se desarrolló un plantador de semillas mecánico (Traber *et al.*, 2003), que permitió llevar a cabo un experimento con semillas de *Zostera marina* sembradas con métodos mecánicos y compararla con los métodos manuales tradicionales en la región de Chesapeake Bay (Orth *et al.*, 2009). Estos autores concluyeron que el establecimiento de las plántulas sigue siendo escaso con ambos métodos, lo que dificulta la restauración de estas praderas, obteniéndose los mejores resultados (18.8%) en semillas inyectadas a mano con pipetas (Orth *et al.*, 2009). En Australia también se desarrollaron técnicas mecánicas para llevar a cabo los trasplantes. Así, desarrollaron en 1996 una máquina sumergible, denominada ECOSUB 1 (1996) y posteriormente ECOSUB 2 (2000), capaz de extraer y trasplantar grandes parcelas de *seagrasses* (0,25 m² y 0,5 m de profundidad) (Paling *et al.*, 2001; Seddon, 2004). Estas parcelas, denominadas *sods*, abarcaban una mayor biomasa y proporcionaban un sistema de anclaje mejor que los métodos manuales (Seddon, 2004). Paling *et al.* (2001) comprobaron que la supervivencia dependía principalmente de la especie, y dos años después del trasplante de *sods* con ECOSUB1 obtuvieron unos porcentajes de supervivencia de 76.8% para *Posidonia sinuosa*, de 75.8% para *P. coriacea* y de 44.3% para *Amphibolis griffithii*. Las técnicas mecánicas han permitido mejorar enormemente el rendimiento, aumentar los porcentajes de supervivencia, acelerar el recubrimiento de zonas dañadas y disminuir los costes de trasplante (Paling *et al.* 2001; Ehringer & Anderson, 2002; Seddon, 2004).

Las experiencias de trasplante con *Cymodocea nodosa* son muy limitadas, presentándose sólo dos citas publicadas, y basadas, en ambos casos, en métodos manuales con fragmentos de plantas adultas recolectadas de praderas donantes. En el año 2003, se publican los resultados obtenidos de experimentos llevados a cabo en el lago de Venice (Italia) por Curiel *et al.*, (2003). Estos autores emplearon dos métodos de trasplante, *sods* y rizomas libres de sedimento unidos al fondo con un clip de plástico (método *staple*), obteniendo unos porcentajes de supervivencia cercanos al 80% dos años después del trasplante. Con ambos tipos de métodos aumentaron la densidad inicial de haces y concluyeron que *C. nodosa* puede ser trasplantada satisfactoriamente, ya que el funcionamiento de la pradera trasplantada, tras dos estaciones vegetativas, es similar al de la pradera natural (Curiel *et al.*, 2003).

El segundo trabajo sobre trasplantes de *Cymodocea nodosa* se llevó a cabo en las Islas Canarias, donde se probaron 4 métodos de trasplante: *sods*, recipientes biodegradables con pequeños *sods* insertos y rizomas libres unidos a cuerdas y mallas (Ruiz de la Rosa *et al.*, 2006). Estos autores concluyeron que el método más efectivo y rentable es el de los *sods* (37% de supervivencia 15 meses después del trasplante), al igual que en el trabajo previo llevado a cabo por Curiel *et al.* (2003), aunque todavía no lo consideran viable para trasplantes a gran escala. Los diferentes resultados de supervivencia obtenidos en ambos estudios pueden ser debidos a que los trasplantes llevados a cabo en Canarias han sido expuestos a un mayor hidrodinamismo, lo que posiblemente ha reducido la supervivencia de los trasplantes (Ruiz de la Rosa *et al.*, 2006).

En general, se puede afirmar que 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. 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 las praderas naturales. Por el momento no se conocen estudios de micropropagación (organogénesis o embriogénesis somática) que hayan tenido éxito con fanerógamas marinas. Los estudios *in vitro* se limitan a la propagación clonal de explantos, como fragmentos de rizoma, o al cultivo en condiciones asépticas de plántulas germinadas *in vitro*.

I.G.2. OBJETIVO GENERAL



Por todo lo anteriormente expuesto:

El trabajo realizado se desarrolla con el objetivo de plantear soluciones a los problemas de conservación que afectan a la especie *Cymodocea nodosa* y su ecosistema en Canarias. De esta forma, se pretenden llevar a cabo estrategias de conservación *ex situ* que incluyan el desarrollo de una técnica de propagación con la que obtener plántulas germinadas a partir de semillas, su aclimatación y trasplante al mar.

Con la experiencia adquirida se establecerán las bases del cultivo *in vitro* a partir de tejido embrionario, para poder obtener, en un futuro, material vegetal con el que llevar a cabo los programas de restauración y trasplante sin recurrir a las praderas naturales.

I.G.3. BIBLIOGRAFÍA

INTRODUCCIÓN GENERAL



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 “sebadales” en el Archipiélago Canario. Vieraea 8, 365-376.

Afonso-Carrillo, J., Sansón, M., 1999. Algas, hongos y fanerógamas marinas de las Islas Canarias. Clave analítica. Servicio de Publicaciones Universidad de La Laguna. La Laguna. pp. 256.

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. Journal of Experimental Marine Biology and Ecology 228, 209-225.

Christensen, P.B., Sortkjaer, O., McGlathery, K.J., 1995. Transplantation of eelgrass. National Environmental Research Institute. Technical Report. pp. 15.

Christensen, P.B., Diaz-Almela, E., Diekmann, O., 2004. Can transplanting accelerate the recovery of seagrasses?. In: European seagrasses: an introduction to monitoring and management. Borum, J., Duarte, C.M., Krause-Jensen, D., Greve, T.M., (Eds). Publisher: The M&MS project. pp. 77-82.

Cooper, G., 1982. Reimplantation de *Posidonia oceanica* protection des implants. Bulletin Ecology 13(1), 65-73.

Curiel, D., Scarton, F., Rismondo, A., Marzocchi, M., 2003. Transplanting seagrasses in the Venice Lagoon: results and perspectives. In: Proceedings of the Sixth International Conference on the Mediterranean Coastal Environment, MEDCOAST 03. Orzhan E. (Ed). pp. 7-11.

Davis, R.C., Short, F.T., 1997. Restoring eelgrass, *Zostera marina* L., habitat using a new transplanting technique: The horizontal rhizome method. Aquatic Botany 59, 1–15.

Den Hartog, C., 1996. Sudden declines of seagrass beds: “wasting disease” and other disasters. In: Seagrass Biology: Proceedings of an International Workshop. Kuo, J., Phillips, R.C., Walker, D.L., Kirkman, H., (Eds). pp. 307-314.

Duarte, C.M., Marbà, N., Santos, R., 2004. What may cause loss of seagrasses? In: European

seagrasses: an introduction to monitoring and management. Borum, J., Duarte, C.M., Krause-Jensen, D., Greve, T.M., (Eds). Publisher: The M&MS project. pp. 24-33.

Duarte, C.M., Gattuso, J.P., 2008. Seagrass meadows. In: Encyclopedia of Earth. Cutler, J.C., (Eds). Washington, D.C.: Environmental Information Coalition, National Council for Science and the Environment.

Ehringer, J.N., Anderson, J., 2002. Seagrass Transplanting and Restoration in Tampa Bay. In: Seagrass Management: Its Not Just Nutrients. Greening, H.S., (Ed). Tampa Bay Estuary Program. St. Petersburg, FL. pp. 39-46.

Erfteimeijer, P.L.A., 2006. Managing the effects of dredging on seagrasses in the Mediterranean Sea. *Biologia Marina Mediterranea* 13 (4), 183-188

Fernández Torquemada, Y., Sánchez Lizaso, J.L. 2006. Effects of salinity on growth and survival of *Cymodocea nodosa* (Ucria) Ascherson and *Zostera noltii* Hornemann. *Biologia Marina Mediterranea* 13 (4), 46-47.

Fonseca, M.S., Cahalan, J.A., 1992. A preliminary evaluation of wave attenuation by four species of seagrass. *Estuarine and Coastal Shelf Science* 35, 565–576.

Fonseca, M.S., Kenworthy, W.J., Courtney, F., Hall, M., 1994. Seagrass planting in the southeastern United States: Methods for accelerating habitat development. *Restoration Ecology* 2 (3), 198-212.

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, MD.

Fonseca, M.S., Julius, B.E., Kenworthy, W.J., 2000. Integrating biology and economics in seagrass restoration: how much is enough and why? *Ecological Engineering* 15, 227-237.

Fonseca, M.S., Wyllie-Echeverria, S., Addison, C., Wyllie-Echeverria, T., 2003. NOAA Joint Pilot Project on Eelgrass (*Zostera marina* L.) Recovery in San Francisco Bay. pp. 23.

Fuss, C.M., Nelly, J.A., 1969. Survival and growth of seagrasses transplanted under artificial conditions. *Bulletin Marine Science* 19, 351-365.

Gil Rodríguez, M.C., Cruz Simó, T., 1982. *Halophila decipiens* Ostenfeld (Hydrocharitaceae) una fanerógama marina nueva para el Atlántico Oriental. *Vieraea* 11(1-2), 207-216.

Gil Rodríguez, M.C., Afonso Carrillo, J., Wildpret de la Torre, W., 1987. Praderas marinas de *Zostera noltii* (Zosteraceae) en las Islas Canarias. *Vieraea* 17, 143-146.

González, N., 1976. Contribución al estudio del epifitismo en *Zostera marina* L. (Zosteraceae) en la Playa de Las Canteras (Gran Canaria). *Botánica Macaronésica* 2, 59-67.

González, N., 1980. Estudio biosistemático de las fanerógamas marinas de Canarias-I. *Botánica Macaronésica* 7, 9-38.

Gordon, D.M., 1996. Status of seagrass restoration: review of international literature. Report to Cockburn Cement Limited. Le Provost Dames & Moore, South Perth, Australia. pp. 41.

Guadalupe, M.E., Gil-Rodríguez, M.C., Hernández-González, M.C., 1995. Fitobentos de Arrecife de Lanzarote, reserva de la biosfera (Islas Canarias). *Cryptogamie Algologie* 16, 33-46.

Hamdorf, I., Kirkman, H., 1995. Status of Australian seagrass. Issues Paper. Fisheries Pollution and Marine Environment Committee. pp. 32.

Haroun, R.J., Gil-Rodríguez, M.C., de Castro, J.D., van Reine, W.F.P., 2002. A checklist of the marine plants from the Canary Islands (Central Eastern Atlantic Ocean). *Botánica Marina* 45 (2), 139-169.

Harwell, M.C., Orth, R.J., 1999. Eelgrass (*Zostera marina* L.) seed protection for field experiments and implication for large scale restoration. *Aquatic Botany* 64, 51-61.

Heidelbaugh, W.S., Hall, L.M., Kenworthy, W.J., Whitfield, P., Virnstein, R.W., Morris, L.J., Hanisak, M.D., 2000. Reciprocal transplanting of the threatened seagrass *Halophila johnsonii* (Johnson's Seagrass) in the Indian River lagoon, Florida. In: *Seagrasses: monitoring, ecology, physiology, and management*. Bortone, S.A., (Ed.). CRC Press, Boca Raton, FL. pp. 197-210.

Herrera-Silveira, J.A., Ramírez-Ramírez, J., Gómez, N, Zaldívar-Jiménez, A., 2000. Seagrass bed recovery after hydrological restoration in a coastal lagoon with groundwater discharges in the North of Yucatan (Southeastern Mexico). In: *Seagrasses: monitoring, ecology, physiology, and management*. Bortone, S.A., (Ed.). CRC Press, Boca Raton, FL. pp. 219-229.

Hughes, A.R., Williams, S.L., Duarte, C.M., Kenneth, L.H.Jr., Waycott, M. 2009. Associations of concern: declining seagrasses and threatened dependent species. *Frontiers in Ecology and the Environment* 7(5), 242-246.

Johansson, J.O.R., Greening, H.S., 2000. Seagrass restoration in Tampa Bay: a resource-based approach to estuarine management. In: *Seagrasses: monitoring, ecology, physiology, and management*. Bortone, S.A., (Ed.). CRC Press, Boca Raton, FL. pp. 279-293.

Kirkman, H., 1998. Pilot experiments on planting seedlings and small seagrass propagules in Western Australia. *Marine Pollution Bulletin* 37, 460–467.

Kuo, J., den Hartog, C., 2001. Seagrass taxonomy and identification key. In: *Global Seagrass Research Methods*. Short, F.T., Coles, R.G., (Eds). Elsevier Science B.V. pp. 31-58.

Kuo, J., den Hartog, C., 2006. Seagrass morphology, anatomy, and ultrastructure. In: *Seagrasses: Biology, Ecology and Conservation*. Larkum, A.W.D., Orth, R.J., Duarte, C.M., (Eds). Netherlands, Springer Verlag, pp. 51-87.

Lepoint, G., Vangeluwe, D., Eisinger, M., Paster, M., Van Treeck, P., Bouquegneau, J-M., Gobert, S., 2004. Nitrogen dynamics in *Posidonia oceanica* cuttings: implications for transplantation experiments. *Marine Pollution Bulletin* 48, 465-470.

Lord, D., Paling, E., Gordon, D., 1999. Review of Australian rehabilitation and restoration programs. In: *Seagrass in Australia: Strategic Review and Development of an R and D Plan*. Butler, A.J., Jernakoff, P., (Eds). CSIRO Publishing, Collingwood, Victoria. pp. 65–115.

Meinesz, A., Caye, G., Loques, F., Molenaar, H., 1993. Polymorphism and development of *Posidonia oceanica* transplanted from different parts of the Mediterranean into the National Park of Port-Cross. *Botanica Marina* 36, 209-216.

Mena, J., Falcón, J. M., Brito, A., Rodríguez, F. M., Mata, M., 1993. Catálogo preliminar de la ictiofauna de las praderas de fanerógamas marinas de la isla de Tenerife, Islas Canarias. *Publicacion Especial Instituto Español Oceanografía*, 217-222.

Molenaar, H., Meinesz, A., Caye, G., 1993. Vegetative reproduction in *Posidonia oceanica* survival and development in different morphological types of transplanted cuttings. *Botanica Marina* 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. *Botanica Marina* 38, 313-322.

Orth, R.J., Luckenbach, M., Moore, K.A., 1994. Seed dispersal in a marine macrophyte: implications for colonization and restoration. *Ecology* 75, 1927-1939.

Orth, R.J., Harwell, M.C., Fishman, J.R., 1999. A rapid and simple method for transplanting eelgrass using single, unanchored shoots. *Aquatic Botany* 64, 77-85.

Orth, R.J., Carruthers, T.J.B., Dennison, W.C., Duarte, C.M., Fourqurean, J.W., James, W., Heck Jr.H.K., Hughes, A.R., Kendrick, G.A., Kenworthy, W.J., Olyarnik, S., Short, F.T., Waycott, M., Williams, S.L., 2006. A global crisis for seagrass ecosystems. *Bioscience* 56, 987-996.

Orth, R.J., Marion, S.R., Granger, S., Traber, M., 2009. Evaluation of a mechanical seed planter for transplanting *Zostera marina* (eelgrass) seeds. *Aquatic Botany* 90(2), 204-208.

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.

Paling, E.I., van Keulen, M., Wheeler, K., Phillips, J., Dyhrberg, R., 2001. Mechanical seagrass transplantation in Western Australia. *Ecological Engineering* 16, 331-339.

Paling, E.I., Van Keulen, M., Tunbridge, D.J., 2007. Seagrass transplanting in Cockburn sound, Western Australia: a comparison of manual transplantation methodology using *Posidonia sinuosa* Cambridge et Kuo. *Restoration Ecology* 15(2), 240-249.

Park, J.I., Lee, K.S., 2007. Site-specific success of three transplanting methods and the effect of planting time on the establishment of *Zostera marina* transplants. *Marine Pollution Bulletin* 54(8), 1238-1248.

Pavón-Salas, N., Garrido, M., Haroun, R., 1998. Distribution and structure of seagrass meadows in Las Canteras beach, Las Palmas, Canary Island (Spain). *Boletim do museu municipal do Funchal*, 50, 107-115.

Pavón-Salas, N., Herrera, R., Hernández-Guerra, A., Haroun, R., 2000. Distribution pattern of seagrasses in the Canary Islands (Central-East Atlantic Ocean). *Journal of Coastal Research* 16, 329-335.

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: *Handbook of Seagrass Biology: An Ecosystem Perspective*. Phillips, R.C., McRoy, C.P., (Eds). Garland STPM Press. New York. pp. 41- 56.

Phillips, R. C., 1990. Transplant methods. In: *Seagrass Research Methods*. Phillips, R.C, McRoy, C.P., (Eds). UNESCO, Paris. pp. 51-54.

Piazzini, L., Balestri, E., Magri, M., Cinelli, F., 1998. Experimental transplanting of *Posidonia oceanica* (L.) Delile into a disturbed habitat in the Mediterranean Sea. *Botanica Marina* 41, 593-601.

Pickerell, C.H., Schott, S., Wyllie Echeverria, S., 2005. Buoy deployed seeding: demonstration of a new eelgrass (*Zostera marina* L.) planting method. *Ecological Engineering* 25, 127-136.

Procaccini, G., Piazzini, L., 2001. Genetic polymorphism and transplantation success in the Mediterranean seagrass *Posidonia oceanica*. *Restoration Ecology* 9(3), 332–338.

Ralph, P.J., Tomasko, D., Moore, K., Seddon, S., Macinnis-Ng, C.M.O., 2006. Human impacts on seagrasses: eutrophication, sedimentation, and contamination. In: *Seagrasses: Biology, Ecology and Conservation*. Larkum, A.W.D., Orth, R.J., Duarte, C.M., (Eds). pp 567-593.

Reyes, J., Sansón, M., Afonso-Carrillo, J., 1995. Distribution and reproductive phenology of the seagrass *Cymodocea nodosa* (Ucria) Ascherson in the Canary Islands. *Aquatic Botany* 50(2), 171-180.

Ruiz de la Rosa, M., Garcia, N., Zarranz, M., Manent, P., Domínguez, R., Grimon, M., Louzara, G., Gonzalez, N., 2006. Preliminary results of experimental evaluation about different methods of transplanting *Cymodocea nodosa* in the Canary Islands. *Biologia Marina Mediterranea* 13(4), 267-271.

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.

Seddon, S., 2004. Going with the flow: Facilitating seagrass rehabilitation. *Ecological Management & Restoration* 5(3), 167 – 176.

Sheridan, P., McMahan, G., Hammerstrom, K., Pulich, W.Jr., 1998. Factors affecting restoration of *Halodule wrightii* to Galveston Bay, Texas. *Restoration Ecology* 6, 144–158.

Terrados, J., Borum, J., 2004. Why are seagrasses important?—Goods and services provided by seagrass meadows. In: *European seagrasses: an introduction to monitoring and management*. Borum, J., Duarte, C.M., Krause-Jensen, D., Greve, T.M., (Eds). The M&MS project. pp. 8-11.

Thorhaug, A., 1983. Habitat restoration after pipeline construction in a tropical estuary: seagrasses. *Marine Pollution Bulletin* 14, 422-425.

Thorhaug, A., 1985. Large-scale seagrass restoration in a damaged estuary. *Marine Pollution Bulletin* 16, 55-62.

Traber, M., Granger, S., Nixon, S., 2003. Mechanical seeder provides alternative method for restoring eelgrass habitat (Rhode Island). *Ecological Restoration* 21, 213-214.

Van Katwijk, M.M., 2003. Reintroduction of eelgrass (*Zostera marina* L.) in the Dutch Wadden Sea; a research overview and management vision. In: *Challenges to the Wadden Sea area, Proceedings of the 10th International Scientific Wadden Sea Symposium*. Wolff, W.J., Essink, K., Kellermann, A., van Leeuwe, M.A., (Eds). Ministry of Agriculture, Nature Management and Fisheries and Dep of Marine Biology University of Groningen.

Van Keulen, M., Paling, E.I., Walker, C. J., 2003. Effect of planting unit size and sediment stabilization on seagrass transplants in Western Australia. *Restoration Ecology* 11(1), 50 – 55.

Vergara Martin, J.M., Haroun Tabraue, R., González Henríquez, M.N., Molina Dominguez L., Briz Miguel, M.O., Boyra Lopez, A., Gutierrez Martinez de Marañón, L., y Ballesta Mendez, A. 2005. Evaluación de impacto ambiental de acuicultura en jaulas en Canarias. Vergara Martin, J.M., Haroun Tabraue, R., González Henríquez, N., (Eds). *Oceanográfica*, Telde. pp. 110.

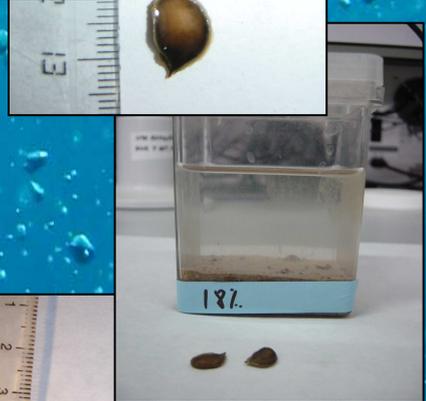
Walker, D.I., McComb, A.J., 1992. Seagrass degradation in Australian coastal waters. *Marine Pollution Bulletin* 25 (5-8), 191-195.

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.

Williams, S.L., Orth, R.J., 1998. Genetic diversity of natural and transplanted eelgrass populations in the Chesapeake and Chincoteague Bays. *Estuaries* 21, 118-128.

CAPITULO I

Propagación in vitro de semillas de Cymodocea nodosa como técnica de restauración ex situ.



I. 1. Introducción Capítulo I.....	24
I.1.1. Distribución de la fanerógama marina <i>Cymodocea nodosa</i>	24
I.1.2. Morfología y fenología reproductiva de <i>Cymodocea nodosa</i>	25
I.1.3. Germinación en la naturaleza de la especie <i>Cymodocea nodosa</i>	28
I.1.4. Inducción de la germinación de semillas de fanerógamas marinas en el laboratorio.....	30
I.1.5. Restauración de praderas a través de semillas y plántulas germinadas <i>in vitro</i>	34
I. 2. Objetivos Capítulo I.....	37
I. 3. Material y Métodos Capítulo I.....	38
I.3.1. Recolección de semillas y condiciones de cultivo.....	38
I.3.2. Seguimiento estructural de la germinación.....	41
I.3.3. Inducción de la germinación con tratamientos de salinidad.....	42
I.3.4. Aclimatación en tanques de las plántulas obtenidas <i>in vitro</i>	44
I.3.5. Evaluación del crecimiento y determinación del momento óptimo para el trasplante.....	45
I.3.6. Experiencias de trasplante al mar.	
a) Determinación de la época óptima de trasplante.....	47
b) Evaluación del crecimiento y supervivencia empleando distintas metodologías de trasplante.....	47
I.3.7. Implementación del protocolo de restauración.....	48

I. 4. Resultados Capítulo I	51
I.4.1. Seguimiento estructural de la germinación.....	51
I.4.2. Inducción de la germinación con tratamientos de salinidad.....	53
I.4.3. Aclimatación de plántulas obtenidas <i>in vitro</i> . Evaluación del crecimiento y determinación del momento óptimo para el trasplante.....	56
I.4.4. Trasplante al mar de plántulas de <i>Cymodocea nodosa</i> .	
a) Determinación de la época óptima de trasplante.....	57
b) Evaluación del crecimiento y supervivencia empleando distintas metodologías de trasplante.....	58
I.4.5. Implementación del protocolo de restauración.....	60
I. 5. Discusión Capítulo I.....	63
I.5.1. Anatomía de la germinación en la especie <i>Cymodocea nodosa</i>	63
I.5.2. Efecto del tratamiento hiposalino en la imbibición de las semillas de <i>Cymodocea nodosa</i>	68
I.5.3. Efecto del tratamiento hiposalino en la germinación de semillas de <i>C. nodosa</i> y condicionamiento del desarrollo posterior de la plántula.....	71
I.5.4. Estudio del crecimiento de las plántulas germinadas <i>in vitro</i>	72
I.5.5. Necesidad de aclimatación de las plántulas de <i>Cymodocea nodosa</i> germinadas en condiciones <i>in vitro</i>	74
I.5.6. El trasplante al mar de plántulas de <i>Cymodocea nodosa</i>	77
I. 6. Conclusión Capítulo I.....	83
I. 7. Bibliografía Capítulo I.....	87
I. 8. Anexo Capítulo I. Figuras.....	97

I.1. INTRODUCCIÓN CAPÍTULO I



1.1.1. La especie *Cymodocea nodosa* se distribuye por el Mar Mediterráneo y el Atlántico Nororiental formando praderas submarinas poco profundas.

Cymodocea nodosa (Ucria) Ascherson (syn: *Cymodocea aequorea*, Koenig) es una fanerógama marina perteneciente a la familia Cymodoceae (Afonso-Carrillo & Gil-Rodríguez, 1980). Aunque su origen es tropical, crece en ambientes templados, con temperaturas que varían entre los 10 y los 30°C (Greve & Binzer, 2004). Actualmente se localiza en el Mar Mediterráneo y en el Atlántico Nororiental, desde el sur de Portugal, hasta las costas de Senegal, incluyendo Madeira y el Archipiélago Canario (Afonso-Carrillo & Gil-Rodríguez, 1980; Reyes *et al.*, 1995; Afonso Carrillo & Sansón, 1999; Pavón-Salas *et al.*, 2000; Cunha & Araújo 2009) (Fig. I.1A).

En el Archipiélago Canario, esta especie forma praderas en fondos arenosos bien iluminados, entre los 2 y los 35 metros de profundidad (Reyes *et al.*, 1995; Pavón-Salas *et al.*, 2000). Las praderas se localizan en las zonas abrigadas de las islas, coincidiendo con las costas de la vertiente Sur y Este y son conocidas con el nombre de seadales (Afonso-Carrillo & 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). Atendiendo a Reyes *et al.* (1995), existen 51 localidades en el litoral de las islas con presencia de praderas de *Cymodocea nodosa* (Fig. I.1B). Por islas, se cita una pradera en las islas de La Palma, El Hierro, La Gomera y La Graciosa, 16 en la isla de Tenerife, 13 en Gran Canaria, 12 en Fuerteventura y 6 en Lanzarote. Actualmente algunos de estos seadales se encuentran en regresión o han desaparecido en su totalidad, como hemos mencionado anteriormente.

Con frecuencia estas praderas crecen de manera aislada, formando comunidades monoespecíficas denominadas *Cymodocetum nodosae* (Fig. I.2A) (Afonso-Carrillo & Gil Rodríguez, 1980), pero también pueden ser mixtas, apareciendo acompañadas por la fanerógama marina *Halophila decipiens* (Pavon-Salas *et al.*, 2000) o por algunas algas verdes del género *Caulerpa*, como *C. racemosa*, *C. mexicana*, o *C. prolifera*, con la que forma importantes asociaciones (Fig. I.2B) (Afonso-Carrillo & Gil Rodríguez, 1980, González, 1986; Pavón-Salas *et al.*, 2000; Barberá *et al.*, 2005). Según González (1986), otras asociaciones pueden estar presentes, como *Cymodocea-Cottoniella*, *Cymodocea-Daysa*, *Cymodocea-Cystoseira abies-marina*, *Cymodocea-Cystoseira-Stypocaulon* o *Cymodocea-Cymopolia*.

I.1.2. *Cymodocea nodosa* presenta la morfología típica de las fanerógamas marinas, además de una floración y fructificación anual.

La morfología de *Cymodocea nodosa* fue descrita con detalle por Bornet (1864) bajo el nombre de *Phucagostis major* Cavalini y más recientemente por Afonso-Carrillo & Gil Rodríguez (1980), Caye & Meinesz (1985) y Reyes & Sansón (1994). Esta especie es un hidrófito herbáceo marino, que presenta un rizoma vegetativo de crecimiento horizontal, del que, a nivel de los nudos, parten raíces y rizomas erectos (Fig. I.2C-D). El rizoma horizontal se denomina plagiótropo, es herbáceo, cilíndrico y con ramificación monopodial (Reyes & Sansón, 1994). Según Caye & Meinesz (1985) pueden alcanzar un índice de crecimiento de 1.80 m/año en praderas de baja densidad. Este rizoma, a su vez, produce ramificaciones secundarias laterales de crecimiento vertical denominadas rizomas ortótropos. Estos rizomas son erectos, poco ramificados y portan a nivel de sus nudos las hojas agrupadas en haces y protegidas por vainas (Reyes & Sansón, 1994). En los rizomas ortótropos se producen las flores y presentan un ritmo de crecimiento menor (1-2 cm/año) (Caye & Meinesz, 1985). Según las condiciones ambientales, ambos tipos de rizomas pueden intercambiar sus funciones, ya que el meristemo apical de los 2 ejes no está diferenciado de forma irreversible, y su modo de crecimiento puede cambiar (Marbá *et al.*, 2004). Así, en poblaciones muy densas, donde hay poco espacio disponible, un rizoma horizontal tiene la capacidad de crecer verticalmente (Caye & Meinesz, 1985). De igual manera, cuando el ápice del rizoma plagiótropo resulta dañado, los ejes verticales pueden asumir un crecimiento horizontal (Reyes & Sansón, 1994; Marbá *et al.*, 2004).

Los rizomas y raíces de *Cymodocea nodosa* presentan la anatomía típica de las monocotiledones (Reyes & Sansón, 1994). Las raíces se forman a nivel de los nudos de los rizomas plagiótropos, como ya se ha mencionado, son adventicias, de color blanquecino y con ramificación monopodial. Las hojas que portan los rizomas erectos son alternas, dísticas y su crecimiento es principalmente por medio de un meristemo basal. Las hojas en desarrollo se mantienen protegidas por las vainas de las hojas maduras del mismo haz, que normalmente quedan enterradas en el sedimento. Las láminas foliares presentan alrededor de 10 nervios paralelos, son alargadas y estrechas, y pueden llegar a medir hasta 40 y 50 cm de largo y 3-5 mm de ancho. Presentan, al igual que otras especies de fanerógamas marinas, dientes marginales, particularmente hacia el ápice de la lámina foliar (Kuo & den Hartog, 2006).

Las flores de *Cymodocea nodosa* son solitarias, unisexuales y carecen de periantio (Bornet, 1864; Afonso-Carrillo & Gil Rodríguez, 1980). Al igual que el resto de miembros de la familia Cymodoceae, *C. 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 & Sansón, 1994) (Fig. I.2E).

Esta especie produce pares de frutos drupáceos, lateralmente comprimidos y con un epicarpio carnoso de color amarillento (Reyes & Sansón, 1994; Kuo & den Hartog, 2006). Son indehiscentes y con maduración geocárpica (Ackerman, 2006; Kuo & den Hartog, 2006). Una vez desarrollados permanecen unos meses unidos a la planta madre, hasta que finalmente maduran y se separan, desprendiéndose al sedimento. Posteriormente el epicarpio se pudre y la semilla permanece enterrada en el sedimento protegida por el endocarpio (Caye & Meinesz, 1986; Reyes & Sansón, 1994).

El ciclo reproductivo de *Cymodocea nodosa*, desde la floración hasta la germinación, dura aproximadamente 1 año, con 1-2 meses para la floración, 2-3 meses para la fructificación y 7-9 meses para la dormancia de las semillas (Buia & Mazzella, 1991; Reyes *et al.*, 1995). La floración suele ser anual, entre los meses de marzo y junio, (Caye & Meinesz, 1985; Reyes *et al.*, 1995) y relativamente abundante, particularmente en praderas densas (Tabla I.1). La fructificación, según Reyes *et al.* (1995), comienza a finales de abril y en mayo se encuentran los primeros haces con frutos maduros (Tabla I.1). Una pauta similar fue observada en distintas localidades del Mediterráneo (Caye & Meinesz, 1985; Pirc *et al.*, 1986; Buia & Mazzella, 1991; Terrados, 1993), aunque aquí se detectó un retraso en la fructificación con respecto a Canarias (julio-agosto en el Mediterráneo; abril-mayo en Tenerife).

Tabla I.1. Recopilación bibliográfica sobre la fenología reproductiva de *Cymodocea nodosa*. (n.d. no datos).

Referencia	Zona	Periodo Floración	Nº Flores	Periodo Fructificación	Nº Frutos o semillas	Periodo Germinación	Nº plántulas germinadas	% Germinación
Caye & Meinesz (1985)	Mar Mediterráneo. Costa francesa	Mayo-Junio	Más de 226 flores m ⁻²	Verano	Entre 80 y 220 semillas m ⁻²	n.d.	2 semillas germinadas en todos sus muestreos	n.d.
Pirc <i>et al.</i> , (1986)	Mar Mediterráneo. Isla de Ischia (Golfo de Nápoles)	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	Mayo- Agosto	n.d.	Máx. en julio con un 54% ⁽¹⁾
Buia & Mazzella (1991)	Mar Mediterráneo. Isla de Ischia (Golfo de Nápoles)	Abril-Junio	Entre 3 y 99 flores m ⁻²	Julio-Agosto	Entre 14 y 340 semillas m ⁻²	Abril-Julio	Hasta 71 plántulas m ⁻²	Máx. en julio con un 100% ⁽²⁾
Terrados (1993)	Mar Menor y Sureste Mediterráneo	n.d.	Entre 0 y 44.8 flores m ⁻²	n.d.	Entre 0 y 220.3 semillas m ⁻² .	n.d.	Entre 0 y 7 plántulas m ⁻²	3.6% ⁽³⁾
Reyes <i>et al.</i> , (1995)	Océano Atlántico. Tenerife	Marzo-Junio	Entre 3 y 353 flores m ⁻²	Abril-Mayo	Entre 55 y 638 frutos m ⁻²	Febrero- Septiembre	Entre 5 y 75 plántulas m ⁻²	Máx. en abril con un 52% ⁽⁴⁾

⁽¹⁾ Pirc *et al.*, (1986): 54% de germinaciones en Julio en relación al muestreo de 100 semillas; 100% = 100 semillas.

⁽²⁾ Buia & Mazzella (1991): 100% de germinaciones teniendo en cuenta las semillas y plántulas encontradas en el mes de julio en la estación D de la pradera de San Pietro (14 plántulas / 14 semillas); 100% = 14 semillas.

⁽³⁾ Terrados (1993): 3.6% de germinaciones teniendo en cuenta el número de frutos totales entre el número máximo de plántulas encontradas en la pradera Venezia en el Mar Menor (7 plántulas / 194 semillas); 100% = 194 semillas.

⁽⁴⁾ Reyes *et al.* (1995): 52% de germinaciones en abril en relación al número de frutos encontrados ese mes (64 plántulas / 122 semillas); 100% = 122 semillas

1.1.3. La especie *Cymodocea nodosa* es del tipo de fanerógamas marinas que forma bancos de semillas donde un porcentaje muy bajo germina en la naturaleza.

Las semillas de *Cymodocea nodosa* son más densas que el agua de mar y se forman en la base de los haces enterrados en el sedimento, por lo que la distancia de dispersión de la planta madre se estima en una escala de centímetros (Buia & Mazzella, 1991; Marbá *et al.*, 2004; Orth *et al.*, 2006). Estas semillas pueden permanecer enterradas en el sedimento en estado de dormancia por un periodo de 7-8 meses y su germinación ocurrir en la primavera siguiente a su formación (Pirc *et al.* 1986; Buia & Mazzella, 1991). Por consiguiente, la escasa dispersión y el estado de dormancia contribuyen a la generación de bancos de semillas permanentes, cuya germinación contribuye más al mantenimiento de praderas establecidas que a la formación de nuevas (Buia & Mazzella, 1991). Tanto en el Mediterráneo como en Canarias se menciona la existencia de bancos de semillas permanentes a lo largo del año (Tabla I.1) (Caye & Meinesz, 1985; Caye *et al.*, 1992; Terrados, 1993; Reyes *et al.*, 1995). Sin embargo, en momentos de gran dinámica del sedimento, provocado por fuertes tormentas o por una gran actividad biótica, las semillas pueden transportarse largas distancias, donde la formación de nuevos parches es posible (Pirc *et al.*, 1986; Terrados, 1993). En este sentido, Terrados (1993) observó plántulas en los alrededores de las praderas, incluso la existencia de parches laxos establecidos a partir de plántulas. Según Marbá *et al.* (2004), la dispersión de semillas se evidencia también por la presencia de praderas separadas más de 300 Km. y porque las semillas de *C. nodosa* pueden observarse en alguna ocasión en las playas.

A pesar del elevado número de frutos generalmente encontrados en el sedimento, se ha documentado la existencia de praderas con ausencia total de germinaciones (Terrados, 1993), praderas donde el número de germinaciones fue muy bajo (Caye & Meinesz, 1985) y praderas donde la germinación fue abundante y recurrente todos los años (Pirc *et al.*, 1986; Buia & Mazzella, 1991; Terrados, 1993; Reyes *et al.* 1995) (Tabla I.1). Respecto a los porcentajes de germinación reflejados en la Tabla I.1, creemos que no representan el potencial germinativo real de las semillas en la naturaleza, ya que para poder calcularlo se deberían de tener en cuenta por una parte el número total de semillas producidas durante todo un año, y por otra el número de plántulas germinadas a lo largo del año siguiente. En este sentido, el estudio más exhaustivo sobre la fenología reproductiva de *Cymodocea nodosa* fue llevado a cabo

por Reyes *et al.* (1995), ya que estudiaron la fructificación y germinación de semillas en la naturaleza durante dos ciclo anuales. Analizando estos resultados, podemos acercarnos a unos valores de germinación en la naturaleza más aproximados a la realidad. Teniendo en cuenta el número de plántulas germinadas a lo largo de un ciclo anual completo y del número de frutos hallados en la naturaleza por estos autores el año anterior, obtenemos un valor de germinación del 5.7% anual (209 plántulas / 3647 semillas). En nuestros propios muestreos, el número de plántulas encontrado es siempre muy bajo (entre 5-6 plántulas por muestreo como máximo), y, a pesar de que no se llevó a cabo un estudio exhaustivo en este sentido, por no estar dentro de nuestro objetivo, podemos afirmar que el número de plántulas germinadas en la naturaleza es muy bajo en relación al elevado número de frutos producidos. En definitiva, se puede concluir que un gran número de propágulos sexuales se pierde irremediamente en la naturaleza. Además, las plántulas germinadas presentan, por lo general, una escasa supervivencia (Caye & Meinesz, 1986; Buia & Mazzella, 1991; Terrados, 1993; Reyes *et al.*, 1995), siendo mayor en praderas bien establecidas que en substratos desnudos (Terrados, 1993; Reyes, 1993). Pirc *et al.* (1986) observaron que el 50% de las plántulas germinadas se perdieron a finales del verano por mortalidad, y, únicamente Terrados (1993) cita la presencia de plántulas de 2 años de edad con un rizoma desarrollado en una pradera del Mar Menor. Según Marbá *et al.* (2004), la mortalidad de las plántulas antes de iniciar un crecimiento clonal se debe a que requieren de la acumulación de gran cantidad de recursos para su crecimiento. **Por los tanto, creemos que puede resultar beneficioso para la conservación de la especie la extracción de las semillas y su germinación en condiciones controladas de laboratorio. Así, aumentar la capacidad de germinación de estas semillas y la supervivencia de las plántulas significaría una buena estrategia para la conservación de la especie y su hábitat.**

El proceso de germinación de *Cymodocea nodosa* ha sido descrito por varios autores (Caye & Meinesz, 1986; Reyes & Sansón, 1994), aunque ninguno presenta una descripción histológica detallada. Describen el inicio de la germinación con la apertura del extremo distal de la cresta dorsal del fruto y la emergencia del cotiledón. En esto coinciden ambos trabajos, pero difieren ligeramente en la descripción posterior. Según Reyes & Sansón (1994), mientras el cotiledón se elonga y se vuelve verde, la radícula se desarrolla, se ablanda, y se cubre de numerosos pelos muy delicados. Cuando el cotiledón alcanza 4 cm de largo pueden diferenciarse las distintas partes del embrión: la radícula; el hipocotilo o primer entrenudo, de color blanco, cilíndrico y con un pequeño

engrosamiento terminal; el cotiledón, cilíndrico y de color verde; y la gémula, situada en el interior de la vaina del cotiledón. Estos autores continúan su descripción con la salida de las dos primeras raíces, que emergen a partir de dos pequeñas protuberancias opuestas a cada lado del engrosamiento distal del hipocotilo. Según Reyes & Sansón (1994), la primera hoja se forma a la vez que el cotiledón y 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. Por otro lado, Caye & Meinesz (1986) no mencionan la formación de la radícula sino la presencia de la plúmula que es expulsada de la semilla. Además, no mencionan la presencia del hipocotilo, ni de la radícula, ni de la gémula, y describen la formación de la primera hoja dentro del cotiledón, el cual funciona como vaina protectora y no es hasta la aparición de la tercera hoja cuando desarrollan las primeras raíces adventicias. **El trabajo llevado a cabo en nuestro laboratorio nos va a permitir contrastar estas definiciones y profundizar en la descripción morfológica e histológica de la germinación en la especie *C. nodosa*.**

1.1.4. La germinación de *Cymodocea nodosa* y otras fanerógamas marinas puede inducirse in vitro alterando las variables físico-químicas del medio.

Se han llevado a cabo numerosas experiencias sobre la germinación de semillas de distintas fanerógamas marinas en el laboratorio que demuestran que la salinidad, la temperatura, la luz, la escarificación del tegumento, y el oxígeno, son algunos de los aspectos clave que influyen en la germinación (Orth *et al.*, 2006).

McMillan (1987, 1988) observó que la luz era un factor importante para inducir la germinación en *Halophila engelmannii* y *H. decipiens*. Las semillas de *H. engelmannii* comenzaban a germinar 3 ó 4 semanas después de la recolección. Se observó un incremento en la germinación bajo condiciones de luz de intensidad elevada y todas las semillas retrasaban la germinación al transferirlas a la oscuridad. Se pudo observar también que las semillas no germinaban si estaban enterradas, y que tras el movimiento del sedimento, y la exposición de las semillas a la luz, comenzaban a germinar permitiendo la colonización de nuevos substratos (McMillan, 1987). Igualmente, las semillas de *H. decipiens* germinaban en 2-3 días tras retirar el sedimento (86%), y bajo condiciones de salinidad de entre 25 y 34 psu (McMillan, 1988). Balestri & Cinelli (1995) recogieron semillas de *Posidonia oceanica* para su germinación en el laboratorio y el estudio de diversos factores (incluido la luz y tipo de contenedor de crecimiento) en

los patrones de germinación, desarrollo y porcentaje de supervivencia de las plántulas. El más alto porcentaje de germinación (86.5 ± 9.2) y de supervivencia (94.4 ± 7.8) se alcanzó a los 18 días en condiciones de luz elevadas. Otras especies, sin embargo, no se ven afectadas por las condiciones lumínicas. Es el caso de las semillas de *Halophila spinulosa*, que mostraron periodos de dormancia de unas 5 semanas, tras lo cual la germinación fue elevada tanto en luz como en oscuridad, aunque todas las plántulas obtenidas murieron en la fase de crecimiento de la segunda o tercera hoja (Birch, 1981). Por otro lado, la luz no se consideró importante en la germinación de especies como *Zostera marina* o *Z. noltii* (Hootsman *et al.*, 1987; Harrison, 1991; Moore *et al.*, 1993).

El nivel de oxígeno y otras propiedades del sedimento son factores que también afectan a la germinación de las semillas. Moore *et al.* (1993) observaron una germinación más rápida en semillas de *Zostera marina* en sedimentos y en frascos con agua donde se retiró el oxígeno, comparado con otras experiencias en presencia de oxígeno. Kawasaki (1993) también mostró que la germinación de *Z. marina* se vio favorecida cubriendo las semillas con sedimento o sumergiéndolas en agua con una cantidad de oxígeno menor de 1 ppm. Por el contrario, los niveles de oxígeno no fueron determinantes en el porcentaje de germinación de *Z. capricorni* (Brenchley & Probert, 1998), ya que éste fue, a 16°C y 15 psu, del 80% tanto en condiciones aeróbicas como anaeróbicas. No obstante, la velocidad de germinación se incrementó en condiciones anaeróbicas (41 días frente a 136 en presencia de O₂). Observaron, por otra parte, que la salinidad no fue una variable determinante. Todos estos resultados contrastan con los obtenidos por Churchill (1992), el cual encontró que las semillas de *Zostera marina* que germinaban y eran retenidas bajo condiciones anaeróbicas no se desarrollaban adecuadamente. De igual manera, Hootsmans *et al.* (1987) observaron que la desecación y las condiciones anaeróbicas fueron letales para las semillas de *Z. marina*.

Las hormonas pueden estimular la germinación o bien inducir el fin de la dormancia (Orth *et al.*, 2000). Loques *et al.* (1990) añadieron concentraciones de giberelinas (GA₇) de 1 ppm que no tuvieron efecto en la germinación de *Zostera noltii*. Sin embargo, soluciones más concentradas de giberelinas (50 ppm GA₃), KNO₃ y thiourea (50 ppm), promovieron la germinación de *Z. capricorni* (Conacher *et al.*, 1994). Años más tarde, Balestri & Bertini (2003) trataron las semillas de *Posidonia oceanica* con un estimulador de la germinación (Sprintene), pero no observaron diferencias significativas en el porcentaje de germinación final.

La salinidad es el factor que más parece afectar la germinación de las fanerógamas marinas. Hootsmans *et al.* (1987) estudiaron la germinación de *Zostera marina* y de *Z. noltii* en el laboratorio, en relación a la temperatura (10, 20 y 30°C), salinidad (1, 10, 20, 30 y 40 psu) y estratificación (4°C). Ambas especies mostraron un máximo de germinación a 30°C y 1 psu de salinidad, disminuyendo con mayores salinidades y menores temperaturas. La estratificación estimuló la germinación sólo con salinidades iguales o superiores a 20 psu. Observaron que ambas especies sobrevivieron mejor a 10°C y 10-20 psu de salinidad para *Z. marina* y 1 psu para *Z. noltii*. Años más tarde, Alexandre *et al.* (2006) estudiaron la germinación de *Z. noltii* en el laboratorio siguiendo el protocolo establecido previamente por Hootsmans *et al.* (1987), y obtuvieron un 70% de germinaciones tras 26 días en condiciones de 1 psu y 22°C. Aumentaron la salinidad a 10 psu tras la germinación y a 20 psu en la fase de plántula, sin embargo, únicamente el 10% de las semillas germinadas alcanzaron esta fase, y todas terminaban muriendo antes de los 72 días. Churchill (1983) estudió la germinación de *Z. marina*, y observó que la baja salinidad (5-10 psu) era la principal variable que promovía la germinación, independientemente de la temperatura. Sin embargo, el estudio cuestionaba la relevancia biológica del efecto de la salinidad, ya que ésta, en muchas zonas del área de estudio, no descendía por debajo de 20 psu.

La disminución de la salinidad es también el principal factor que permite la germinación de semillas en el género *Cymodocea* (McMillan *et al.*, 1982; Caye & Meinesz, 1986). McMillan *et al.* (1982) obtuvieron los mayores porcentajes de germinación (88%) en *C. rotundata* con salinidad de 15 psu, mientras que a 35 psu fue del 46%. Caye & Meinesz (1986) indujeron la germinación de semillas de *C. nodosa* a lo largo del año bajo condiciones de laboratorio de salinidad reducida y temperaturas superiores a los 17°C. Comprobaron que la germinación aumentó rápidamente con el incremento de la temperatura (de 10 a 34°C) y con el descenso de la salinidad (de 27 psu a 0 psu), pudiéndose alcanzar un 90% de germinaciones en 10 días, en cualquier momento del año. Posteriormente, Caye *et al.* (1992) comprobaron que cuando la salinidad era de 38 psu la germinación no tenía lugar, mientras que con salinidades reducidas (20 psu) se veía favorecida. Con salinidad de 10 psu (0.3 osm l⁻¹) la germinación era rápida y elevada, pudiéndose inducir a lo largo del año en agua dulce.

Por otra parte, hay estudios que no han mostrado un efecto de la salinidad en la germinación. Por ejemplo, McMillan (1981) estudió la germinación de las semillas de

Halodule wrightii y *Syringodium filiforme* 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: de 5 a 50 psu para *Halodule* y entre 20 y 50 psu para *Syringodium*.

En otras ocasiones, se demostró que el factor limitante no era la salinidad sino la temperatura. McMillan (1983) observó que la germinación de las semillas de *Zostera marina* era similar en condiciones de salinidad de 15 o 35 psu, y se inhibía a 28-32°C, rango de temperatura cercano a las condiciones estivales. Orth & Moore (1983) también observaron que la mayoría de las semillas de *Z. marina* germinaban con temperaturas entre 0 y 10°C sin importar el régimen de salinidad al que estaban expuestas.

En varios estudios se ha demostrado una interacción entre la disminución de la salinidad y la escarificación de la cubierta seminal. Loques *et al.* (1990) estudiaron la germinación de *Zostera noltii*, con distintos tratamientos de temperatura, salinidad, estratificación e incisión en el tegumento de la semilla. De todos ellos, la disminución de la salinidad (1-10 psu) y la incisión en el tegumento fueron los que aumentaron el porcentaje de germinación. Conacher *et al.* (1994) también demostraron que las semillas de *Zostera capricorni*, con tratamientos de salinidad baja (1-10 psu) e incisiones en la cubierta seminal, germinaban de manera rápida y completa. Así mismo, la escarificación de la cubierta de la semilla, junto a una disminución de la salinidad, ha resultado en un incremento de los índices de germinación en *Zostera marina* (Harrison, 1991). Caye *et al.* (1992) observaron que la incisión o eliminación del tegumento de la semilla en la especie *Cymodocea nodosa* aceleró la germinación cuando la salinidad era de 20 psu (90% de germinaciones a las 24 horas), pero no afectó con salinidad de 38 psu, lo que indicó que el tegumento lo único que hace es alargar el tiempo de germinación. Otros autores, sin embargo, no encontraron efecto al eliminar el tegumento de la semilla en distintas especies como *Halophila engelmannii*, *H. decipiens* y *H. spinulosa* (McMillan, 1987, 1988; Birch, 1981).

Por otra parte, en algunas especies como *Halophila spinulosa*, no se observó ninguna tendencia en la germinación, independientemente del tratamiento (Birch, 1981). Este autor estudió la germinación de la especie con varias intensidades de luz y temperatura, reducción de salinidad, ausencia o presencia de sustrato, escarificación, y presencia o ausencia de nutrientes. Bajo ningún tratamiento las semillas germinaban antes de las 5 semanas, interpretándose que existía un control interno de la dormancia.

I.1.5. Las semillas y plántulas germinadas *in vitro* ofrecen un método eficiente y rentable para la restauración de praderas de fanerógamas marinas.

Las técnicas basadas en el empleo de rizomas o fragmentos de pradera para la restauración y rehabilitación a gran escala, pueden causar un grave daño a las praderas donantes, por lo que muchos autores piensan que deben emplearse otras técnicas menos destructivas, como semillas o plántulas germinadas *in vitro*. Así, varios trabajos centran su atención en las semillas, su producción, dispersión y estrategias de reclutamiento, además de su papel potencial en proyectos de restauración (Orth *et al.*, 1994; Harwell & Orth, 1999; Orth *et al.*, 2000; Kenworthy, 2000; Inglis, 2000; Granger *et al.*, 2002; Balestri & Bertini, 2003; Orth *et al.*, 2009). La importancia del empleo de semillas, como técnica de restauración menos destructiva, radica en su capacidad para el establecimiento de praderas (Duarte & Sand-Jensen, 1990; Meehan & West, 2004; Olesen *et al.*, 2004), para el mantenimiento de la diversidad genética (Waycott, 1995; Procaccini & Piazzini, 2001; Reusch, 2002), y para la recolonización de áreas perturbadas de forma más rápida que la propagación vegetativa (Plus *et al.*, 2003, Whitfield *et al.*, 2004; Greve *et al.*, 2005). Por todo ello, la protección de las praderas existentes, especialmente aquellas que son fuente de un gran número de semillas, deben de ser prioridad en la gestión de los recursos (Orth *et al.*, 2006).

Según Ailstock & Shafer (2006), la propagación de semillas ofrece el mecanismo más barato para la restauración a gran escala, diverso genéticamente, y que permite el automantenimiento de las poblaciones de fanerógamas marinas. Estos autores hacen referencia en su trabajo a los tres métodos normalmente empleados para el almacenamiento de semillas y su dispersión en proyectos de restauración:

- 1°. La dispersión de semillas nada más ser recolectadas (Pickerell *et al.*, 2005).
- 2°. El almacenamiento e incubación de semillas en tanques con flujos continuos de agua de mar para facilitar la maduración del embrión y su germinación. La distribución se lleva a cabo a través de las semillas ya maduras o germinadas, y se estudia el establecimiento posterior de las plántulas (Orth *et al.*, 1994; Harwell & Orth, 1999; Piazzini *et al.*, 1999).
- 3°. El almacenamiento durante tiempos más prolongados, con el fin de tener semillas disponibles siempre que sean necesarias.

En algunos proyectos de restauración y rehabilitación de praderas se ha contemplado el uso de semillas o plántulas germinadas *in vitro* como alternativa al empleo de plantas adultas (Addy, 1947; Thorhaug, 1974; 1985; Cooper, 1982; Meinesz *et al.*, 1993; Orth *et al.*, 1994, 2009; Kirkman, 1998; Balestri *et al.*, 1998; Harwell & Orth, 1999; Granger *et al.*, 2002; Seddon, 2004; Seddon *et al.*, 2004; Pickerell *et al.*, 2005; Wear *et al.*, 2006). Thorhaug (1985), por ejemplo, tras un programa de restauración a gran escala donde probó varios métodos de trasplante con diferentes especies, concluyó que el método de trasplante más rentable era a través de semillas. En algunos trabajos con *Zostera marina*, las semillas fueron recolectadas recogiendo los haces fértiles de la pradera natural y almacenándolos en tanques con agua de mar hasta que las semillas maduraron y fueron liberadas (Orth *et al.*, 1994; Harwell & Orth, 1999). A continuación se dispersaron al medio natural y alrededor del 15% de las semillas viables consiguieron establecerse, alcanzando el 41-56% cuando las semillas se protegían con bolsas (Harwell & Orth, 1999). En este sentido, Granger *et al.* (2002) dieron una guía completa del método empleado para restaurar praderas de *Z. marina* por medio de semillas, recogiendo primero los haces fértiles para su fructificación en tanques aireados, y conservado las semillas para su germinación y posterior trasplante. Recientemente, Pickerell *et al.* (2005) describieron un método innovador para la restauración de praderas de *Z. marina* en las costas de EEUU (Sag Harbor Cove, NY) basado en la dispersión de semillas. Este método consistía en recoger los haces fértiles y disponerlos en mallas suspendidas en boyas fijas. A medida que las semillas maduraban, traspasaban la red y se dispersaban naturalmente. Las semillas, ya en el sedimento, germinaban y formaban praderas debajo de cada boya. Observaron que el reclutamiento era del 6.9%, de acuerdo al número de semillas de cada malla. La ventaja de este método era que se eliminaba la necesidad de almacenar los haces fértiles, y que una vez entrenados, los ciudadanos podían participar en la recolección de haces, aumentando la conciencia y el valor hacia los programas de restauración. En la actualidad, Orth *et al.* (2009) han llevado a cabo un experimento de trasplante con semillas de *Z. marina* sembradas con métodos mecánicos y manuales, donde observaron que el establecimiento de las plántulas seguía siendo escaso con ambos métodos (hasta un máximo del 18.8%), lo que dificulta considerablemente la restauración de estas praderas.

En el caso del trasplante con plántulas procedentes de la germinación de semillas *in vitro*, se han llevado a cabo diversas experiencias con distintas especies de fanerógamas marinas. En el Mediterráneo, se han realizado experimentos de trasplante con plántulas de *Posidonia oceanica* desde los años 70 y 80 (Cooper, 1982; Meinesz *et al.*, 1993; Balestri *et al.*, 1998, Piazzini *et al.*, 1998). En particular, el grupo de Piazzini consiguió un 70% de supervivencia tres años después del trasplante, lo que supone que las plántulas de *P. oceanica* pudieron ser empleadas para la restauración del área concreta de este estudio, en el mar de Liguria (Mediterráneo, Italia). En Australia, Kirkman (1998) llevó a cabo varios ensayos de trasplante con plántulas de *Posidonia* y *Amphibolis*. Obtuvo los mejores resultados de supervivencia con las especies *Posidonia australis* y *P. sinuosa*, las cuales permanecieron vivas varios años después del trasplante. Varias técnicas novedosas para la restauración de praderas están siendo estudiadas actualmente en Australia. Entre ellas, la de conseguir fijar las plántulas al sedimento con recipientes biodegradables (Seddon *et al.*, 2004), o la de favorecer el reclutamiento natural de especies como *Amphibolis antarctica* y *A. griffithii*, mediante el empleo de sustratos artificiales (Wear *et al.*, 2006). Estos autores obtuvieron unos rangos de reclutamiento de entre 6 y 141 plántulas m⁻² (según el tipo de saco biodegradable empleado) doce meses después de su instalación, por lo que lo consideraron como un método factible para restaurar praderas en zonas con moderado hidrodinamismo.

Tras la revisión bibliográfica realizada, hemos constatado que el empleo de semillas y plántulas germinadas *in vitro*, como estrategia para la restauración o mitigación de praderas *ex situ*, no se ha descrito para la especie *Cymodocea nodosa* en las Islas Canarias ni en otras regiones del mundo.

I.2. OBJETIVOS CAPÍTULO I



El objetivo principal de este capítulo es la obtención de plántulas de *Cymodocea nodosa* en el laboratorio, su aclimatación y trasplante al mar, como futura medida para la recuperación y restauración de praderas degradadas o en regresión. Dividimos el estudio en cuatro fases:

I) Obtención de plántulas de *Cymodocea nodosa* a partir de semillas germinadas de forma aséptica, y bajo condiciones controladas en el laboratorio. En base a los antecedentes realizaremos distintos tratamientos con baja salinidad para inducir la germinación. Determinaremos cuál es el mejor tratamiento y estudiaremos el crecimiento y desarrollo posterior de las plántulas. El estudio se completa con una descripción morfológica de la germinación, y los estudios histológicos correspondientes del fruto, la semilla y la plántula recién germinada.

II) Fase de aclimatación en tanques y acuarios. Una vez obtenidas las plántulas se aclimatarán en los acuarios bajo determinadas condiciones de luz, temperatura y flujo continuo de agua de mar. Al final del experimento determinaremos las pautas de crecimiento en esta fase, y estableceremos el momento óptimo para el trasplante al mar.

III) Trasplante al mar. Superada la aclimatación, las plántulas se llevarán al mar, empleando distintos métodos de anclaje, y se realizará un seguimiento durante los meses siguientes para obtener datos de supervivencia y crecimiento. Se determinará el método más apropiado de trasplante y la mejor época del año para llevarlos a cabo.

IV) Aplicaciones. Una vez desarrollado el protocolo para la obtención de plántulas a partir de semillas germinadas en el laboratorio, su aclimatación y trasplante al mar, llevaremos a cabo una experiencia de restauración a mayor escala dentro del “Proyecto piloto sobre la evaluación de las metodologías para la reubicación de la fanerógama marina *Cymodocea nodosa* de la zona costera de Granadilla (Tenerife)”.

I.3. MATERIAL Y MÉTODOS

CAPÍTULO I



I.3.1. Recolección de semillas y condiciones del cultivo *in vitro*.

Para la obtención de semillas con las que llevar a cabo las distintas experiencias de germinación, se eligió una pradera situada en la costa sureste de Gran Canaria, en la localidad de Juan Grande (27°48'00"N; 15°25'40"W) (Fig. I.3A). Se trata de un sebadal en buen estado de conservación, cuyo límite inferior está situado a 4 metros de profundidad. La recogida de semillas se llevó a cabo por medio de inmersiones con escafandra autónoma. Las semillas se encontraron tanto en la superficie del sedimento como a pocos centímetros de profundidad (hasta 15-20 cm), entre las raíces de las plantas, y se fueron guardando en mallas con un diámetro de poro que permite la entrada de agua y la salida de arena y otros restos. Una vez fuera del mar, y hasta la puesta en germinación de las semillas, se guardaron en botes con agua de mar y en condiciones de oscuridad para evitar una posible activación de la semilla.

Previo a la siembra y para prevenir el crecimiento de la flora bacteriana asociada, se realizó un tratamiento de esterilización superficial de las semillas. Éste consistió en una limpieza con un cepillo de dientes, para sumergirlas a continuación en una solución de agua de mar estéril durante 10 minutos, conteniendo un 10% de lejía comercial y una gota de Tween 80 como agente tensoactivo (Aisltock *et al.*, 1991). Finalmente, se lavaron 3 veces en agua de mar esterilizada.

Las semillas se sembraron en recipientes tipo Magenta^R-G7 (Sigma Co.USA) con 40 ml de arena y 200 ml de agua de mar esterilizada (Fig. I.4). El agua de mar se diluyó previamente con agua ultrapura (Millipore Q Gard ® 2) para llevar a cabo los distintos tratamientos de shock hiposalino que veremos en el apartado I.3.3. En las diluciones, la salinidad resultante se ajusta linealmente a la relación proporción de agua de mar y agua ultrapura (v:v). Así, el agua de mar con salinidad de 36 psu, tras la dilución al 50% (v:v), reduce su salinidad a 18 psu. Igualmente, siguiendo el *Handbook of chemistry and Physics* (Weast & Astle, 1981), los valores de osmolaridad y presión osmótica resultantes de la dilución del agua de mar se ajustan linealmente a las ecuaciones de la Fig. I.5.

A continuación se enriqueció el agua de mar con nutrientes y soluciones nutritivas. El medio de cultivo empleado se presenta en las Tablas I.2-I.5 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.*, 2006).

Tabla I.2. 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-destilada).

Compuesto	Cantidad (mg)
FeSO ₄ .7H ₂ O	50,34
H ₃ BO ₃	1140
Mn SO ₄ . H ₂ O	122,90
ZnCl ₂	10,48 (*)
CoCl ₂	4,03 (*)
Na-EDTA.2 H ₂ 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.3. Composición de la solución de EDTA ferroso (EDTA-Fe) del medio PES (cantidad de compuesto para 50 ml de agua bi-destilada).

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

Tabla I.4. Composición de la solución de vitaminas empleadas en la elaboración del medio PES (cantidades para 100 ml de agua bi-destilada).

Vitamina	Cantidad (mg)
Tiamina-HCl	100
Biotina	1(*)
Piridoxina	1(*)
B ₁₂	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 B₁₂ (preparar y añadir en su totalidad)*

Tabla I.5. Composición final del medio de cultivo PES (Provasoli, 1968) reformulado según García-Jimenez *et al.*, (2006).

Compuesto o solución	Cantidad
NH ₄ Cl	70 mg
KH ₂ PO ₄	10 mg
Solución PII	1 ml
Solución EDTA-Fe	0,5 ml
Solución vitaminas	1 ml
Agua de mar	1000 ml

Las soluciones de las Tablas I.2 a I.4 son las soluciones madre de los nutrientes, de las cuales añadimos una pequeña cantidad al medio (Tabla I.5). 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 válido 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 I.5), el nitrógeno se añade como cloruro de amonio y el fósforo como fosfato potásico monobásico, ya que son las formas químicas que mejor asimilan los explantos de *Cymodocea nodosa* (García-Jiménez *et al.*, 2006).

Finalmente, los recipientes de cultivo, conteniendo la arena y el agua de mar enriquecida y diluida a la correspondiente salinidad, se esterilizaron en el autoclave (121°C, 20 min) y se dejaron reposar durante 24 horas previo a la siembra de las semillas, para que se depositara la arena y se igualaran los niveles de fósforo y nitrógeno entre el agua y el sedimento. Los cultivos se mantuvieron en una cámara de cultivo modelo Koxka a $24 \pm 2^\circ\text{C}$, fotoperiodo 18:6 (luz:oscuridad) y $30 \mu\text{moles de fotones m}^{-2} \text{s}^{-1}$ a nivel de los recipientes de cultivo.

1.3.2. Seguimiento estructural de la germinación de semillas de C. nodosa.

Las semillas y frutos recolectados, así como las plántulas germinadas *in vitro* (que fueron divididas en 3 partes: zona apical, intermedia y basal), sirvieron para realizar una descripción morfológica e histológica de la germinación, del fruto, la semilla y la plántula recién germinada. Para realizar el estudio histológico se siguió el protocolo descrito previamente en García-Jiménez *et al.* (1998).

El material vegetal fue fijado durante 4 horas, a temperatura ambiente, en una solución fijadora al 5% de glutaraldehído (v:v) en solución tampón de cacodilato sódico 0.1 M y sacarosa 0.25 M. La sacarosa se añadió para mantener la osmolaridad de la solución entre 1 y 1.5 Osm L⁻¹. A continuación se realizaron 4 lavados de 15-30 minutos de duración cada uno, con la misma solución de cacodilato sódico 0.1 M en ausencia del fijador, y disminuyendo gradualmente la concentración de sacarosa (0.25 M, 0.125 M, 0.0625 M y 0 M).

Después de la fijación, el material vegetal fue sometido al proceso de pre-infiltración e infiltración. El proceso de pre-infiltración, consistente en eliminar el agua del tejido, se realizó sometiéndolo a vacío durante 2 horas en una solución 1:1 (v:v) de etanol al 95% y la solución de infiltración. La solución de infiltración se preparó disolviendo 0.5 g de activador en 50 ml de *Basic Resin* (Historesin Embedding Kit, marca registrada). A continuación se sumergió el material vegetal en solución de infiltración durante toda la noche en condiciones de vacío.

El material fue incluido en Glicol-Metacrilato (GMA, HistoresinTM, Reichert-Jung). Para ello, el material fue depositado y orientado en los moldes en la posición adecuada, donde se le añadió la solución de inclusión. Ésta se preparó con 15 ml de solución de infiltración y 1 ml de endurecedor. La polimerización transcurrió a 50°C durante 10-15 minutos y se dejó reposar toda la noche.

Se obtuvieron secciones seriadas de 3 µm, cortadas con cuchilla de tungsteno en un microtomo marca Reichert-Jung modelo 2050. Los cortes se depositaron en un baño de agua destilada a temperatura ambiente para su estiramiento, se recogieron en portas y se mantuvieron en una estufa a 50°C. Una vez adheridos, los cortes fueron teñidos con azul de toluidina durante 1 minuto o con hematoxilina durante 15 minutos para teñir la estructura general de las células (Tsekos, 1983), y lavadas con abundante agua destilada. Las preparaciones fueron observadas con un microscopio óptico, Olympus U-SPT y una lupa Olympus SZ-PT, fotografiadas con una cámara de fotos MicroPublisher 3.3 RTV, y tratadas con un programa de captación de fotos QCapture.

1.3.3. Inducción de la germinación en semillas de *Cymodocea nodosa* con distintos tratamientos hiposalinos.

Se empleó el shock hiposalino como método de inducción de la germinación de semillas de *Cymodocea nodosa*. Se recolectaron y sembraron 104 semillas en abril de 2005 para llevar a cabo los tratamientos con distintas salinidades. Se trataron las semillas con 4 salinidades distintas (36.6, 18.3, 11.16 y 5.05 psu), mediante dilución del agua de mar con agua ultrapura (Millipore Q Gard ® 2), según la Tabla I.6.

Tabla I.6. Proporción, en porcentaje, de agua de mar y agua ultrapura necesarias para obtener las salinidades de 36, 18, 11 y 5 psu que hemos empleado en los tratamientos de shock hiposalino y la osmolaridad resultante (Osm L^{-1}), de acuerdo a la ecuación obtenida en la Fig. I.5.

PSU	% Agua de mar	% Agua ultrapura	Osm L¹ Osmolaridad
36.6	100	0	1.0518
18.3	50	50	0.5394
11.16	30.50	69.50	0.3395
5.05	13.80	86.20	0.1684

Para cada tratamiento de salinidad se emplearon 13 recipientes con 2 semillas en cada uno (26 semillas por tratamiento). A partir del segundo mes, las semillas o plántulas recién germinadas fueron trasplantadas a recipientes tipo magenta, conteniendo la arena y el agua de mar enriquecida, y salinidad de 36 psu para favorecer su crecimiento y desarrollo posterior.

Se tomaron datos sobre el porcentaje de germinación y estado de crecimiento una vez al mes, durante los tres meses siguientes a la siembra (mayo, junio y julio). Se creó un índice de 0 a 3 según el estado de desarrollo de la plántula, para poder estudiar la germinación de las semillas y su crecimiento posterior (Tabla I.7).

Los resultados obtenidos permitieron definir el tratamiento más efectivo para la inducción de la germinación y el desarrollo de las plántulas, el cuál se empleó en todo el trabajo posterior de la tesis.

Tabla I.7. Estados de desarrollo de la plántula según el índice creado para estudiar la germinación de las semillas y su crecimiento.

Estado de desarrollo	Características	
0	No se ha inducido la germinación, la semilla permanece en estado de dormancia.	
1	El extremo de la cresta dorsal de la semilla se abre permitiendo la salida del cotiledón	
2	El cotiledón se elonga y se vuelve verde.	
3	Plántula con 1 o 2 hojas desarrolladas y primeras raíces emitidas.	

Análisis estadístico y representaciones gráficas.

Para comparar la frecuencia de semillas germinadas y la frecuencia de las plántulas que alcanzan el estado 3 de desarrollo según los diferentes tratamiento de salinidad, se realizaron tablas de contingencia y se analizaron empleando el Test de Chi cuadrado ($p < 0.05$). Se emplearon los programas SPSS®13.0 for Windows® (SPSS Inc. Chicago, Illinois, USA) para el análisis estadístico y el Sigmaplot 8.02 para la representación gráfica.

I.3.4. Aclimatación de plántulas de *Cymodocea nodosa* obtenidas a partir de semillas germinadas en el laboratorio.

Una vez que las plántulas germinadas en el laboratorio alcanzaban el estado 3 de desarrollo, es decir, desarrollaban la primera y segunda hoja, continuaban con la fase de aclimatación. Esta fase pretende simular las condiciones naturales del medio marino, favoreciendo el crecimiento de las plántulas en condiciones controladas.

Para las primeras experiencias de aclimatación se emplearon acuarios de 0.15 m³, con una profundidad de arena de 10 cm y flujo continuo de agua de mar (Fig. I.6A-B). Se obtuvieron unos datos medios de luz en el acuario de 81.55 $\mu\text{moles de fotones m}^{-2} \text{s}^{-1}$ en días luminosos, 8.09 $\mu\text{moles de fotones m}^{-2} \text{s}^{-1}$ en días nublados, y 38.95 $\mu\text{moles de fotones m}^{-2} \text{s}^{-1}$ en días intermedios, medidos con un radiómetro LI. 192SA Underwater Quantum Sensor de Licor-INC. Los valores medios de temperatura y oxígeno disuelto en el acuario fueron de 23,09°C y 6,21 mg l⁻¹ respectivamente, frente a los 22,71°C y 6,71 mg l⁻¹ obtenidos como promedio en aguas de Canarias, ambos parámetros medidos con una sonda YSI63.

Para las experiencias de aclimatación a mayor escala, utilizamos tanques de 1.68 m³, con una profundidad de arena de 20 cm, flujo continuo de agua de mar y una temperatura media de 22,9°C (Fig. I.6C-E). Tal y como se puede apreciar en las fotos, estos tanques disponen de un techo sombreado para disminuir la intensidad lumínica que incide sobre las plántulas, con un promedio de luz incidente de 60 $\mu\text{moles de fotones m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

1.3.5. Evaluación del crecimiento durante la aclimatación y determinación del momento óptimo para el trasplante.

Se cultivaron en los acuarios 30 plántulas en estado 3 (julio 2005) y se numeraron del 1 al 30 para realizar el estudio biométrico. Las plantas permanecieron 45 días en el acuario, y cada 15 días se midió la longitud de la hoja más larga desde su inserción con la semilla; se contó el número de raíces, hojas y haces foliares, y se midió la longitud de la raíz más larga. Para evaluar el crecimiento se determinaron los siguientes índices:

Tasa de Crecimiento Foliar (cm d^{-1}):

$$\text{TCF} = \text{LF}_{t_1} - \text{LF}_{t_0} / t_1 - t_0 \quad (\text{Eq. 1})$$

TCF = Tasa de Crecimiento Foliar

LF = Longitud máxima foliar.

$t_1 - t_0$ = Intervalo de tiempo de 15, 30 ó 45 días.

Tasa de Emisión de Haces Foliares (n° haces foliares d^{-1}):

$$\text{TEHF} = \text{NHF}_{t_1} - \text{NHF}_{t_0} / t_1 - t_0 \quad (\text{Eq. 2})$$

TEHF = Tasa de Emisión de Haces Foliares.

NHF = N° de haces foliares.

$t_1 - t_0$ = Intervalo de tiempo de 15, 30 ó 45 días.

Tasa de Emisión de Hojas (n° hojas d^{-1}):

$$\text{TEH} = \text{NH}_{t_1} - \text{NH}_{t_0} / t_1 - t_0 \quad (\text{Eq. 3})$$

TEH = Tasa de Emisión de Hojas.

NH = N° de hojas.

$t_1 - t_0$ = Intervalo de tiempo de 15, 30 ó 45 días.

Tasa de Emisión de Raíces (n° raíces d⁻¹):

$$TER = \frac{NR_{t_1} - NR_{t_0}}{t_1 - t_0} \quad (Eq. 4)$$

TER = Tasa de Emisión de Raíces.

NR = N° de raíces.

t₁-t₀ = Intervalo de tiempo de 15, 30 ó 45 días.

Tasa de Crecimiento de la Raíz (cm d⁻¹):

$$TCR = \frac{LR_{t_1} - LR_{t_0}}{t_1 - t_0} \quad (Eq. 5)$$

TCR = Tasa de Crecimiento de la Raíz.

LR = Longitud de la raíz principal.

t₁-t₀ = Intervalo de tiempo de 15, 30 ó 45 días.

Además de obtener las tasas de crecimiento absolutas durante el periodo de 45 días, se calcularon y representaron gráficamente las tasas de crecimiento en intervalos de 15 días, con el fin de determinar el periodo de crecimiento máximo de las plántulas en la fase de aclimatación y poder determinar así el momento óptimo para el trasplante. Se evaluó también el crecimiento mediante la representación de los valores medios de longitud foliar, longitud de raíces y número de haces y raíces cada 15 días.

Los resultados obtenidos permitieron determinar el periodo de aclimatación necesario para el crecimiento de las plántulas en condiciones semicontroladas, que se empleará en el desarrollo de todo el trabajo de tesis.

Análisis estadístico y representaciones gráficas.

Se analizó la variabilidad de las tasas de crecimiento y de los valores medidos a lo largo del tiempo mediante ANOVA de un factor y Post Hoc Tests (TukeyHSD y DunnettT3) en los casos en que los datos siguen distribuciones normales y varianzas homogéneas (tasa de crecimiento foliar y radicular, y longitud media foliar), y el test de Kruskal-Wallis y Mann-Whitney cuando no siguen distribuciones normales (tasas de emisión de haces foliares y raíces, y valores medios de número de haces, número de raíces y longitud de raíz). Se emplearon los programas SPSS®13.0 for Windows® (SPSS Inc. Chicago, Illinois, USA) para el análisis estadístico y el Sigmaplot 8.02 para la representación gráfica.

1.3.6. Experiencias de trasplante con plántulas de *Cymodocea nodosa* obtenidas a partir de semillas germinadas en el laboratorio y aclimatadas en tanques.

a) Determinación de la época óptima de trasplante a lo largo del año.

Se llevaron a cabo varias experiencias de trasplante, entre los meses de abril a septiembre de 2006, para determinar el momento óptimo de trasplante. Cada mes se llevaban al mar plantas aclimatadas y germinadas a partir de semillas en el laboratorio, para evaluar así cual es la mejor época para el trasplante. Todas las plántulas tenían 3 meses de edad (1.5 meses para la germinación y 1.5 meses de aclimatación).

Las plántulas se ataron previamente a mallas de nylon y se fijaron con grapas metálicas al fondo (Fig. I.7A). Estas mallas sirvieron como soporte para mejorar el anclaje y evitar las pérdidas por fuertes corrientes.

Las plántulas se sembraron en el borde de una pradera laxa situada en una zona protegida cerca del muelle de Taliarte (Gran Canaria) (Fig. I.3B), a una profundidad de 6 metros, y de fácil acceso para permitir la monitorización del crecimiento.

Se realizó el seguimiento de las plántulas durante los meses siguientes al trasplante y se calculó su supervivencia y su tasa de crecimiento foliar en intervalos de tiempo de 30 días (*Eq. I*).

b) Evaluación del crecimiento y la supervivencia de las plántulas empleando distintas metodologías de trasplante.

Una vez determinada la mejor época para realizar los trasplantes se llevaron a cabo 3 experimentos (mayo 2008) en los que se determinó la importancia del periodo de aclimatación, del método de anclaje empleado y de la densidad inicial de las plántulas (Tabla I.8). Se eligió el mismo borde de pradera laxa situado cerca del muelle de Taliarte (Gran Canaria) para realizar los trasplantes (Fig. I.3B).

En todos los experimentos, una vez las plántulas en el mar, y cada 30 días, se tomaron datos del número de plántulas presentes y de la longitud foliar durante un periodo de 9 meses. Los datos se presentan como porcentaje de supervivencia, longitud media foliar y tasa de crecimiento foliar (*Eq. I*) para cada periodo de 30 días.

Tabla I.8. Experimentos de trasplante con distintos métodos y periodos de aclimatación.

Experimentos	Periodo de aclimatación (días)	Nº de plántulas	Densidad inicial (plántulas m ⁻²)	Método de trasplante
Experimento 1	30	60	500	mallas
Experimento 2	60	94	3333	recipientes biodegradables
Experimento 3	0	76	3377	libres

Para el experimento 1 se ataron con hilo un total de 60 plántulas, aclimatadas durante 30 días, a tres mallas de tela de 20 x 20 cm (lo que equivale a una densidad inicial de 500 plántulas m⁻²), que sirvieron como soporte y que fueron fijadas con grapas metálicas al fondo (Fig. I.7A).

En el experimento 2 se emplearon 94 plántulas aclimatadas durante dos meses en recipientes biodegradables de fibra de coco de 9 x 12 cm, los cuales permiten un crecimiento saludable de las raíces a través del recipiente (Fig. I.7B). Cada uno presenta 12 compartimentos de 3 x 3 x 5 cm, en los cuales se sembraron 3 plántulas, hasta un máximo de 36 plántulas por recipiente, obteniéndose una densidad inicial de 3333 plántulas m⁻².

En el tercer experimento (Fig. I.7C) se usaron 76 plántulas sin ningún tipo de anclaje al sustrato ni periodo de aclimatación y se sembraron todas juntas formando un cepellón denso y ocupando una superficie de 20 x 20 cm (~3377 plántulas m⁻²).

1.3.7. Implementación del protocolo de restauración en una pradera ubicada en la isla de Tenerife.

Se llevaron a cabo 2 experimentos (abril y noviembre de 2006) para evaluar el procedimiento completo de propagación desde el laboratorio hasta la implantación en una pradera natural que va a ser afectada por la construcción de un puerto en la costa este de la isla de Tenerife (Granadilla; 28°05'06"N; 16°29'06"W) (Fig. I.8A).

Los experimentos se enmarcan dentro del “Proyecto piloto sobre la evaluación de las metodologías para la reubicación de la fanerógama marina *Cymodocea nodosa* de la zona costera de Granadilla (Tenerife)”, llevado a cabo por el Departamento de Gestión Litoral y Desarrollo Sostenible del Instituto Canario de Ciencia Marinas.

Los tratamientos de germinación *in vitro* se realizaron en los laboratorios de fisiología y biotecnología vegetal marina (Biología) de la Universidad de las Palmas de Gran Canaria (ULPGC), y la aclimatación de las plántulas en las instalaciones de cultivo del Instituto Canario de Ciencia Marinas (ICCM).

a) Recolección, esterilización y germinación de semillas.

La recolección de semillas se llevó a cabo por medio de inmersiones con escafandra autónoma en una pradera situada en la costa sureste de la isla de Tenerife (Fig. I.8A). Las semillas recogidas para cada experiencia se conservaron en agua de mar hasta su posterior tratamiento en los laboratorios de la ULPGC.

Se esterilizaron (según la metodología descrita anteriormente) un total de 463 semillas (116 magentas) en abril y 564 (141 magentas) en diciembre de 2006. Las semillas, en número de 4 por cada recipiente de cultivo, se sembraron en medios esterilizados, conteniendo la arena y el agua de mar enriquecida y diluida (18 psu), tal y como se ha descrito previamente.

A los 30 días se les renovó el medio de cultivo aumentando la salinidad a 36 psu. Los cultivos se mantuvieron en una cámara de cultivo tipo Koxka a $24 \pm 2^\circ\text{C}$, fotoperiodo 18:6 (luz:oscuridad) y $30 \mu\text{moles de fotones m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

b) Aclimatación.

Mes y medio después de la siembra, las plántulas con un tamaño adecuado fueron llevadas a las instalaciones de cultivo del ICCM, para su posterior crecimiento y aclimatación en tanques (Fig. I.9A-D).

Del total de plántulas obtenidas a partir de la germinación de semillas (338 en el experimento 1 y 417 en el experimento 2) se eligieron 30 al azar para realizar el estudio de crecimiento durante la aclimatación en tanques.

Se tomaron medidas de la longitud de la hoja más larga desde su inserción con la semilla; se contó el número de raíces, hojas y de haces foliares, y se midió la longitud de la raíz más larga. Los datos se presentan en forma de tasas de crecimiento desde el momento que comienza la aclimatación (t_0) hasta que son trasplantadas al mar (t_1) ($t_1 - t_0 = 60$ días para la primera experiencia y 35 días para la segunda), empleando las mismas fórmulas descritas anteriormente (Eq. 1 a 5).

c) Trasplante al mar.

En agosto de 2006 y marzo de 2007 se llevaron a cabo las campañas de trasplante de plántulas germinadas *in vitro*. Las plántulas fueron transportadas, desde las instalaciones de cultivo del ICCM en la isla de Gran Canaria, hasta Tenerife, en neveras refrigeradas con agua de mar aireada.

Previo al trasplante, las plántulas se ataron de 15 en 15 a mallas de 20 x 20 cm (densidad inicial de 375 plántulas m⁻²) para facilitar su transporte y fijación al sustrato. Se llevaron un total de 338 plántulas atadas a 23 mallas en la primera experiencia, y 417 plántulas atadas a 28 mallas en la segunda.

Se construyeron unas jaulas con mallas metálicas de 0.25 m² para evitar los posibles ataques por herbivoría, y en cada una de ellas se dispuso una malla con 15 plántulas (Fig. I.9E-F). Las jaulas se distribuyeron en una zona cercana a un borde de pradera (Fig. I.8B), a 10 metros de profundidad, y ocupando una superficie de arena de 625 m² y equidistantes 0.5 m entre ellas.

Se realizó el seguimiento de las plántulas durante los meses siguientes, en intervalos de tiempo de 60 días, eligiendo al azar entre 30 y 80 plántulas. En ellas se midió la longitud de la hoja más larga, se contó el número de hojas y de haces foliares, y se calculó igualmente las tasas de crecimiento en intervalos de tiempo de 60 días, empleando las formulas descritas previamente (Eq. 1 a 3).

I.4. RESULTADOS CAPÍTULO I



I.4.1. Seguimiento estructural de la germinación de semillas de *C. nodosa*.

Tras las numerosas inmersiones y muestreos llevados a cabo en las praderas de *Cymodocea nodosa*, se ha corroborado, tal y como se ha descrito previamente, que esta especie produce pares de frutos drupáceos con un epicarpio carnoso de color amarillento (Fig. I.10A-B). Son indehiscentes, lateralmente comprimidos, y miden entre 10 y 15 mm de largo, 2 mm de grosor y 8 mm de ancho. De forma semicircular, poseen un ápice alargado que puede prolongarse hasta los 10 mm (Fig. I.10B). Una vez desarrollados, los frutos permanecen unos meses unidos a la planta madre hasta que finalmente maduran y se separan, desprendiéndose al sedimento. Posteriormente el epicarpio se pudre y la semilla permanece enterrada en el sedimento protegida por el endocarpio.

Macroscópicamente, las semillas de *Cymodocea nodosa* son también semicirculares y lateralmente comprimidas, con una coloración que varía entre el amarillo y el marrón oscuro (Fig. I.10C). El endocarpio es liso, duro y coriáceo, con una cresta ondulada en la parte dorsal. Esta cresta dorsal es la línea de dehiscencia por donde se produce la germinación (Fig. I.10D). La parte ventral es más recta y gruesa. Las semillas suelen medir entre 10-12 mm de largo, 7-8 mm de ancho y 1 mm de grosor. La semilla se encuentra rodeada por una fina cubierta o cutícula denominada testa, y en las semillas jóvenes puede verse una cicatriz o hilio, que marca el punto por donde el fruto estaba adherido al tallo (Fig. I.10D). En el interior de la semilla se encuentra el embrión triangular, formado por el cotiledón y el hipocotilo. El hipocotilo, que ocupa la mayor parte de la semilla, es triangular y de color blanquecino. El cotiledón es cilíndrico, y está dispuesto a lo largo del eje dorsal de la semilla (Fig. I.10D).

Microscópicamente distinguimos en el embrión de la semilla el hipocotilo y el cotiledón, en el cual se inserta un meristemo foliar apical o plúmula (SAM o *Shoot Apical Meristem*) (Fig. I.11A). El hipocotilo está formado por un conjunto de células compactas cargadas de sustancias de reserva (almidón), que se emplearán como la principal fuente de nutrientes durante la germinación y posterior desarrollo de la plántula (Fig. I.11B). Estructuralmente, el cotiledón está rodeado de células epidérmicas y formado por células compactas que protegen al SAM (Fig. I.11C-E). En las semillas sin germinar no se aprecia el meristemo radicular (RAM o *Root Apical Meristem*) y carecen de un tejido vascular desarrollado.

La germinación de las semillas de *Cymodocea nodosa* se inicia con la apertura de la cresta dorsal y la emergencia del cotiledón (Fig. I.12A). El cotiledón crece por alargamiento celular, y arrastra consigo el meristemo foliar o plúmula. El cotiledón, que es cilíndrico y blanco en un primer momento (Fig. I.12B), continúa su crecimiento hasta que una vez superado el sustrato se vuelve verde, entre los días 10 y 15 (Fig. I.12C), convirtiéndose en el primer órgano fotosintetizador de la plántula. El cotiledón crece hasta alrededor del día 20, alcanzando un tamaño medio de 3.52 ± 0.094 cm (Fig. I.12D). A partir de este momento el cotiledón no va a crecer más, y permanecerá en la plántula durante varias semanas. En la base del cotiledón se observa el primer entrenudo, de color blanquecino, a partir del cual se forman las 2 primeras raíces que nacen de forma opuesta (Fig. I.12D), y en ningún caso se observó la emergencia de la radícula. Prácticamente al mismo tiempo, cerca del día 25, se desarrolla la primera hoja a partir del meristemo foliar o SAM situado en la parte superior del primer entrenudo del cotiledón (Fig. I.12E). Alrededor del día 30 emerge la segunda hoja, con la consiguiente formación del primer haz y se desarrollan nuevas raíces seminales en la base del primer entrenudo (Fig. I.12F). El día 35 es ya una plántula desarrollada conformada por un haz, 3 hojas y varias raíces seminales (Fig. I.12G).

De las secciones histológicas realizadas a la plántula recién germinada, distinguimos en el ápice del cotiledón células muy alargadas y vacuolizadas (Fig. I.13A-C). A lo largo de todo el cotiledón se diferencian claramente una epidermis, un parénquima de células cargadas de sustancias de reserva y un sistema vascular central (Fig. I.14A-C). En la zona intermedia del cotiledón se localiza el meristemo foliar o SAM (*Shoot Apical Meristem*), formado por células meristemáticas en la base y conectado con el meristemo radicular por medio del sistema de haces vasculares (Fig. I.15A). Se pueden apreciar, además, varias yemas laterales y un primordio foliar bastante desarrollado, emergiendo del cotiledón (Fig. I.15B-C). En la base del cotiledón (Fig. I.16A-F) se observan células con sustancias de reserva, que se alargan y tabican, compactándose y conformándose en el meristemo radicular o RAM (*Root Apical Meristem*), a partir del cual se forman las 2 primeras raíces. Se observa también el comienzo del tejido vascular que conecta el meristemo radicular con el meristemo foliar (Fig. I.16E-F).

1.4.2. Inducción de la germinación en semillas de *Cymodocea nodosa* con distintos tratamientos de salinidad.

En la Tabla I.9 se muestra el número de semillas germinadas y el porcentaje de germinación según los diferentes tratamientos de salinidad (nº de semillas germinadas por tratamiento/total sembradas por tratamiento, n = 26) y el porcentaje de germinación total a lo largo de los 3 meses de estudio (número total de semillas germinadas cada mes/total sembradas, n = 104).

Tres meses después de la siembra se obtuvieron un 59.61% de germinaciones teniendo en cuenta todos los tratamientos empleados. Se puede observar que el grueso de las germinaciones se dio en el primer mes, con un 45.19% del total. Estas germinaciones fueron debidas, en su mayoría, a la respuesta de las semillas a los tratamientos con salinidad reducida (5 psu y 11 psu). En el segundo y tercer mes, el porcentaje de germinación total aumentó ligeramente, con un incremento de 11 y 3 puntos respectivamente en relación al mes anterior (56.73% y 59.61%). Estas germinaciones más tardías ocurrieron con los tratamientos de mayor salinidad (36 psu y 18 psu), en los cuales la inducción de la germinación se ve ligeramente retardada.

Tabla I.9. Número y % de semillas germinadas según los diferentes tratamientos de salinidad (nº de semillas germinadas por tratamiento/total sembradas por tratamiento, n = 26) y % de germinación total a lo largo de 3 meses (número total de semillas germinadas cada mes/total sembradas, n = 104). Diferente letra entre paréntesis hace referencia a diferencias significativas entre tratamientos ($p < 0.05$).

Duración del experimento		Germinación por salinidad				Germinación total
		n = 26	5 psu	11 psu	18 psu	36 psu
Mes 1	Nº semillas germinadas	21	19	7	0	47
	%	80.77 ^(a)	73.08 ^(a)	26.92 ^(b)	0.00	45.19
Mes 2	Nº semillas germinadas	21	20	13	5	59
	%	80.77 ^(a)	76.92 ^(a)	50.00 ^(a,b)	19.23 ^(b)	56.73
Mes 3	Nº semillas germinadas	21	20	15	6	62
	%	80.77 ^(a)	76.92 ^(a)	57.69 ^(a)	23.08 ^(b)	59.61

Los porcentajes de germinación que se observan en la Tabla I.9, en relación a los tratamientos de salinidad, muestran cómo los tratamientos de menor salinidad, de 5 y 11 psu, indujeron la germinación de forma elevada desde el primer mes, mostrando

diferencias significativas respecto a los tratamientos de 18 y 36 psu ($p < 0.05$). El tratamiento de salinidad de 5 psu es el que inicialmente mejor indujo la germinación de las semillas, con un 80.77% de germinaciones, que se mantuvo constante a lo largo de todo el experimento, sin registrarse nuevas germinaciones. El tratamiento de salinidad de 11 psu indujo igualmente una germinación elevada desde el primer mes, con un 73.08% del total de las semillas, ascendiendo ligeramente en el segundo mes (76.92%) y manteniéndose constante hasta el final del experimento. El tratamiento con salinidad de 18 psu indujo la germinación de forma progresiva a lo largo de los tres meses de estudio. De una germinación inicial de 26.92% en el primer mes, se llegó al 50% en el segundo, para finalizar en el tercero con un máximo del 57.69%. El tratamiento control, con salinidad de 36 psu, fue el único que no indujo la germinación desde el primer momento, y no fue hasta el segundo y tercer mes cuando se obtuvieron un 19.23% y un 23.08% de germinaciones respectivamente. El porcentaje de germinación final obtenido con este tratamiento resultó ser significativamente inferior al resto de tratamientos ($p < 0.05$).

En la Tabla I.10 se muestra el número y el porcentaje de semillas germinadas que alcanzan el estado 3 de desarrollo (plántula con 1 o 2 hojas desarrolladas y primeras raíces emitidas) según los diferentes tratamientos de salinidad (número de semillas germinadas en estado 3 por tratamiento/total sembradas por tratamiento, $n = 26$) a lo largo de los 3 meses de estudio. Alcanzar este estado de desarrollo va a permitir a las plántulas pasar a la fase de aclimatación.

Tabla I.10. Número y porcentaje de semillas germinadas que alcanzan el estado 3 de desarrollo según los diferentes tratamientos de salinidad (nº de semillas germinadas en estado 3 por tratamiento/total sembradas por tratamiento, $n = 26$) a lo largo de los 3 meses de estudio. Diferente letra entre paréntesis hace referencia a diferencias significativas entre los tratamientos ($p < 0.05$).

Duración del experimento	n = 26	Desarrollo según el tratamiento de salinidad			
		5 psu	11 psu	18 psu	36 psu
Mes 1	Nº semillas en estado 3	0	1	1	0
	%	0.00	3.85	3.85	0.00
Mes 2	Nº semillas en estado 3	0	7	12	5
	%	0.00	26.92 ^(a)	46.15 ^(a)	19.23 ^(a)
Mes 3	Nº semillas en estado 3	0	10	15	6
	%	0.00	38.46 ^(a)	57.69 ^(a)	23.08 ^(a)

Observamos en esta tabla cómo la viabilidad de las plántulas obtenidas, y su desarrollo posterior, se ve condicionado por el tratamiento de salinidad empleado. Conforme disminuye la salinidad el porcentaje de germinación aumenta, pero la viabilidad de las plántulas disminuye. Así, el tratamiento de menor salinidad (5 psu) fue el que mejor indujo la germinación, pero no produjo ninguna plántula viable que continuara con un desarrollo normal. Todas las semillas germinadas con este tratamiento (80.77%, Tabla I.9) murieron en el estado 1 de crecimiento. Algo similar ocurrió con el tratamiento de salinidad de 11 psu, que indujo un elevado porcentaje de germinación desde el primer mes (73.08%, Tabla I.9), pero sólo una pequeña proporción de estas semillas (38.46%) siguieron un crecimiento normal, alcanzando en el tercer mes el estado 3 de desarrollo (Tabla I.10). El resto de las semillas germinadas a 11 psu (38.46%) murieron en el estado 1 (apertura de la semilla y emergencia del cotiledón), y no continuaron con su desarrollo. Sin embargo, en el tratamiento control, de 36 psu, aunque la germinación no es muy elevada y no comienza hasta el segundo mes (19.2%, Tabla I.9), todas las plántulas crecieron y se desarrollaron bien, alcanzando en poco tiempo el estado de mayor crecimiento. Finalmente todas las semillas germinadas con este tratamiento (23.08%) llegaron hasta la fase de aclimatación (Tabla I.10). Lo mismo ocurre con el tratamiento de 18 psu, que resultó ser el tratamiento que permitió que un mayor porcentaje de semillas germinadas continuara con un crecimiento normal hasta alcanzar el estado 3 de desarrollo (plántula con 1 o 2 hojas desarrolladas), pasando todas ellas a la fase de aclimatación (57.69%, Tabla I.10).

A pesar de que los análisis estadísticos no muestran diferencias significativas en el número de semillas que alcanzan el estado de mayor desarrollo entre los tratamientos de 11, 18 y 36 psu (Tabla I.10), consideramos el tratamiento de 18 psu como el más apropiado para la inducción y posterior desarrollo de las plántulas, el cual emplearemos en todo el trabajo posterior de tesis.

I.4.3. Aclimatación de plántulas de *C. nodosa* obtenidas a partir de semillas germinadas en el laboratorio. Evaluación del crecimiento y determinación del momento óptimo para el trasplante.

En la Fig. I.17 se muestran las imágenes de las plántulas aclimatadas durante un periodo de 30-45 días en acuarios (A-D) y de las plántulas aclimatadas en tanques durante 60 días sobre recipientes biodegradables (E-F).

En la Tabla I.11 observamos los diferentes índices empleados para monitorizar el crecimiento de las plántulas durante el periodo de aclimatación de 45 días (tasa de crecimiento de la hoja larga y de la raíz principal, tasa de emisión de raíces y de haces). De ellos se deduce que el crecimiento de la plántula fue mayoritariamente de la parte aérea, hasta 3 veces superior al de la raíz ($0.479 \pm 0.027 \text{ cm d}^{-1}$ de la hoja frente a los $0.132 \pm 0.017 \text{ cm d}^{-1}$ de la raíz).

Tabla I.11. Índices de crecimiento durante el periodo de aclimatación (45 días, $n = 30$). Los datos representan la media aritmética \pm el error estándar.

	Media		EE
Tasa Crecimiento Foliar (cm d^{-1})	0.479	\pm	0.027
Tasa Crecimiento Raíz (cm d^{-1})	0.132	\pm	0.017
Tasa Emisión Raíz ($\text{n}^\circ \text{ raíces d}^{-1}$)	0.064	\pm	0.009
Tasa Emisión Haz ($\text{n}^\circ \text{ haces d}^{-1}$)	0.012	\pm	0.003

En la Figura I.18 se representan los índices de crecimiento durante el periodo de aclimatación de 45 días, en intervalos de tiempo de 15 días y respecto al día de siembra (tasas de crecimiento de 0 a 15, de 0 a 30 y de 0 a 45), y en la Figura I.19 los valores medios de longitud foliar, longitud de raíces y número de haces y raíces cada 15 días.

En la Fig. I.18 se observan las mayores tasas de crecimiento a los 30 días tras el comienzo de la aclimatación, con unos valores máximos de crecimiento foliar y radicular de $0,50 \pm 0,03 \text{ cm d}^{-1}$ y $0.18 \pm 0.02 \text{ cm d}^{-1}$ respectivamente, y de emisión de haces foliares de $0.013 \pm 0.0037 \text{ haces d}^{-1}$ (Fig. I.18A-C). En el caso de la emisión de raíces, la planta dedicó el mayor esfuerzo en el primer intervalo de tiempo, hasta el día 15, con una tasa de emisión de $0,083 \pm 0.014 \text{ raíces d}^{-1}$ (Fig. I.18D), y disminuyó ligeramente en los etapas siguientes ($0,076 \pm 0.009 \text{ raíces d}^{-1}$ entre los días 15 y 30, y $0.067 \pm 0.0078 \text{ raíces d}^{-1}$ entre los días 30 y 45).

En la Fig. I.19 se observa cómo las plántulas presentaron un crecimiento progresivo a lo largo del periodo de 45 días, manifestándose igualmente un mayor crecimiento hasta el día 30 (flechas, Fig. I.19). En el caso de la longitud foliar (Fig. I.19A), se observó un incremento progresivo a lo largo del periodo de aclimatación, mostrando diferencias significativas en todos los tramos de estudio ($p < 0.05$). Para el número de haces emitidos (Fig. I.19B), el crecimiento fue más lento, encontrándose diferencias significativas cada 30 días. En el caso de la raíz, no hubo diferencias significativas entre el día 30 y 45, tanto para la longitud de la raíz (Fig. I.19C) como para el número de raíces (Fig. I.19D), lo que nos indica que a partir del día 30 se estabiliza el crecimiento y la emisión de raíces, como ya hemos mencionado anteriormente. El momento óptimo para el trasplante se ha tomado, por consiguiente, 30 días después de iniciada la aclimatación (flechas, Fig. I.18 y I.19).

1.4.4. Trasplante con plántulas de *Cymodocea nodosa* obtenidas a partir de semillas germinadas en el laboratorio y aclimatadas en tanques.

a) Determinación de la época óptima de trasplante a lo largo del año.

Se llevaron a cabo varias experiencias de trasplante con plántulas fijadas a mallas entre los meses de abril a septiembre de 2006. En la Fig. I.20 se muestran las tasas de crecimiento de la hoja (media \pm ee) respecto al mes anterior, durante los meses que permanecieron las plántulas con vida. En los distintos meses y experiencias observamos unas tendencias oscilantes, en muchos casos tasas de crecimiento negativas, debidas principalmente a la pérdida de biomasa aérea por parte de herbívoros. En general, se observaron las hojas mordidas y en muchas ocasiones sólo permanecía la vaina enterrada y protegida por la arena. Esto debilita mucho a las plántulas, que permanecen con vida durante algunos meses pero no consiguen sobrevivir por largos periodos y finalmente acaban muriendo, como vemos en los diferentes gráficos de supervivencia (Fig. I.21). La mortalidad se acentúa a partir de los meses de octubre y noviembre, y ninguna plántula sobrevive en diciembre. El mal estado de las plántulas, carentes de parte aérea, les impide superar las etapas más desfavorables de crecimiento que se dan de forma natural durante el invierno. Así, las plántulas que fueron sembradas en abril y mayo fueron las que permanecieron con vida durante mayor tiempo, 6 y 5 meses respectivamente.

b) Evaluación del crecimiento y la supervivencia de las plántulas empleando distintas metodologías de trasplante.

Se llevaron a cabo 3 experimentos en los que se determinó la importancia del periodo de aclimatación, del método de anclaje empleado y de la densidad inicial de las plántulas. En la Figura I.22 se presentan los datos de supervivencia y de longitud media foliar de las plántulas transplantadas según los diferentes métodos de trasplante a lo largo de 9 meses de estudio. Las tasas de crecimiento foliar respecto al mes anterior se detallan en la Tabla I.12.

Tabla I.12. Tasa de crecimiento foliar mensual (cm d^{-1}) de las plántulas transplantadas con diferentes métodos de anclaje a lo largo de los 9 meses de estudio.

Tasa de crecimiento Foliar (cm d^{-1})	ACLIMATADAS		NO ACLIMATADAS
	Mallas de nylon	Recipientes biodegradables	Libres en cepellón
Mes 1	-0.047	-0.567	0.136
Mes 2	-0.168	0.100	0.071
Mes 3	-0.040	0.147	-0.090
Mes 4	0.193	-0.100	0.011
Mes 5	-0.029	0.138	0.060
Mes 6	nd	-0.070	-0.010
Mes 7	nd	-0.003	-0.070
Mes 8	nd	-0.008	-0.018
Mes 9	nd	-0.007	0.010

Se puede observar cómo para el experimento 1, que se llevó a cabo atando las plántulas a mallas de 20 x 20 cm con una densidad inicial de 500 plántulas m^{-2} (Fig. I.23A-B), las tasas de crecimiento son negativas durante los 3 primeros meses (Tabla I.12), pasando de una longitud media foliar de 17.16 ± 0.84 cm en el momento del trasplante a 9.50 ± 1.04 cm en el tercer mes (Fig. I.22B). Esta disminución es debida a los ataques por herbivoría, como ya se ha mencionado antes, y en la Fig. I.23C-E pueden apreciarse las plántulas sembradas en mallas y afectadas por el herbivorismo dos meses después del trasplante. Las tasas de crecimiento foliar se recuperan a partir del cuarto y quinto mes (Tabla I.12), con longitudes medias foliares de 15.28 ± 1.68 y 14.41 ± 2.28 cm respectivamente (Fig. I.22B), pero no así la supervivencia, que disminuye

progresivamente alcanzando un 15% en el 5º mes, para finalmente terminar muriendo a los 180 días, correspondientes al mes de noviembre (Fig. I.22A).

Las plántulas del experimento 2 fueron llevadas al mar en recipientes biodegradables y sembradas formando un cepellón denso (~ 3333 plántulas m^{-2}) (Fig. I.24A-B). La tasa de crecimiento en el primer mes es muy negativa (-0.567 $cm\ d^{-1}$) (Tabla I.12), pasando de una longitud media foliar de 24.57 ± 0.91 a 7.56 ± 0.81 cm (Fig. I.22B). Esta fuerte disminución de la longitud foliar es debida a los ataques por herbivoría, como puede observarse en la Fig. I.24C-D. En el segundo mes las plántulas se recuperan ligeramente obteniéndose una tasa de crecimiento positiva (0.10 $cm\ d^{-1}$) (Tabla I.12). Se observa, además, cómo se han formado rizomas apicales y un importante entramado de raíces (Fig. I.24E-F). A partir del tercer mes las plántulas permanecen estables, con un ligero descenso en la supervivencia, pero manteniendo valores cercanos al 30% hasta el final del experimento (Fig. I.22A).

Las plántulas sembradas libres sin métodos de anclaje, formando un cepellón denso (~ 3377 plántulas m^{-2}) y sin periodo de aclimatación (Fig. I.25A), presentan un crecimiento positivo desde el primer mes (0.136 $cm\ d^{-1}$) (Tabla I.12), pasando de 10.86 ± 0.30 cm en el momento del trasplante a 14.96 ± 0.57 cm en el primer mes y 17.08 ± 0.72 cm en el segundo (Fig. I.22B). Estas plántulas no han sufrido ataques por herbivoría, y se observa, además, la presencia de rizomas plagiótrofos desarrollados de unos 3 cm de longitud tras el primer mes de trasplante (Fig. I.25B-D). A partir del segundo mes las plántulas se mantienen estables con unos índices de supervivencia muy elevados, del 100% hasta el sexto mes y ligeras pérdidas al final del experimento, manteniéndose un porcentaje final del 68.5% en el noveno mes, correspondiente al mes de febrero (Fig. I.22A y Fig. I.25E-F).

1.4.5. Implementación del protocolo de restauración en una pradera ubicada en la isla de Tenerife.

El protocolo de restauración desarrollado en este trabajo se escaló para propagar cientos de semillas con las que proveer de plántulas a una pradera que va a ser restaurada en la costa sureste de Tenerife tras ser afectada por la construcción de un puerto.

a) Germinación de semillas

En la Tabla I.13 se muestran los resultados de germinación, en porcentaje, de los experimentos llevados a cabo en abril y diciembre de 2006. Dos meses después de la siembra con salinidad de 18 psu, el porcentaje de germinación fue elevado y muy similar en ambos casos, con un 73% en abril y un 74% en diciembre. En este estudio, para calcular el porcentaje de germinación final, se tuvieron en cuenta únicamente las plántulas que continuaron su crecimiento de forma adecuada y llegaron a desarrollar una o dos hojas, necesarias para pasar a la fase de aclimatación.

Tabla I.13. Porcentaje de germinación de las semillas en las dos épocas del año mencionadas.

Mes de siembra	Nº total semillas	Semillas germinadas	% Germinación
Exp. 1 (Abril 2006)	463	338	73
Exp. 2 (Diciembre 2006)	564	417	74

b) Aclimatación.

Las plántulas procedentes de las semillas germinadas en el laboratorio (338 en el experimento 1 y 417 en el experimento 2), fueron aclimatadas en tanques (Fig. I.9A-D) hasta que alcanzaban una biomasa foliar y radicular suficiente para llevar a cabo los trasplantes (60 días para la primera experiencia y 35 días para la segunda). Del total de plántulas sembradas en cada experiencia, se seleccionaron 30 al azar para realizar el estudio de crecimiento durante la aclimatación. En la Tabla I.14 se muestran los valores medios de los diferentes parámetros medidos (longitud foliar, longitud radicular y nº de raíces, de hojas y de haces foliares) en el momento t_0 y t_1 para la primera (junio/agosto 2006) y segunda (enero/febrero de 2007) experiencia de aclimatación. En todos los casos observamos un aumento de los valores medios en t_1 respecto a t_0 , excepto en la emisión de hojas y de haces foliares.

En relación a las tasas de crecimiento durante el periodo de aclimatación ($t_1-t_0 = 60$ días para la primera experiencia y 35 días para la segunda) (Tabla I.14), observamos de igual manera la existencia de un crecimiento positivo de las plántulas en el tanque, excepto para la emisión de haces y hojas que nos da una tasa de crecimiento negativa, lo que significa que en este periodo apenas han producido haces nuevos, y las hojas existentes más viejas se han sustituido por nuevas.

Tabla I.14. Valores medios en el momento t_0 y t_1 y tasas de crecimiento para todos los parámetros medidos durante los distintos periodos de aclimatación ($n = 30$). n.d = no data.

	1ª Aclimatación (junio/agosto 2006)		2ª Aclimatación (enero/febrero 2007)	
	T_0	T_1 (60d)	T_0	T_1 (35d)
Longitud Media Foliar (cm)	15.80 ± 0.61	29.91 ± 2.11	10.12 ± 0.34	17.54 ± 0.61
Longitud Media Raíces (cm)	n.d.	n.d.	3.11 ± 0.17	5.89 ± 0.57
Nº Medio Raíces	n.d.	n.d.	3.63 ± 0.14	4.27 ± 0.20
Nº Medio Hojas	4.37 ± 0.20	4.23 ± 0.18	4.00 ± 0.18	4.20 ± 0.23
Nº Medio Haces Foliare	1.17 ± 0.07	1.17 ± 0.07	1.33 ± 0.08	1.23 ± 0.08
Tasa Crecimiento Foliar (cm d^{-1}):		0.235		0.212
Tasa Crecimiento de la Raíz (cm d^{-1}):		n.d.		0.079
Tasa Emisión de Raíces (n° raíces d^{-1}):		n.d.		0.018
Tasa Emisión de Hojas (n° hojas d^{-1}):		-0.002		0.006
Tasa Emisión de Haces (n° haces d^{-1}):		0.000		-0.003

Por otra parte, al igual que ya observamos en las experiencias de aclimatación previas, la planta dedicó un mayor esfuerzo al crecimiento foliar en relación al crecimiento radicular. En la 2ª aclimatación, que duró 35 días, observamos cómo las hojas crecieron 0.212 cm d^{-1} frente a los 0.08 cm d^{-1} de las raíces.

Se observa, además, una mayor tasa de crecimiento foliar en los meses de verano (0.235 cm d^{-1}) en comparación a los meses de invierno (0.212 cm d^{-1}), lo que puede significar que es una época mas favorable para el crecimiento y la aclimatación.

c) Trasplante al mar.

Todas las plántulas aclimatadas en tanques (338 en el experimento 1 y 417 en el experimento 2) sobrevivieron a la fase de aclimatación, y se llevaron al mar atadas de 15 en 15 a mallas de 20 x 20 cm ($375 \text{ plántulas m}^{-2}$) y protegidas por jaulas para evitar

posibles ataques por herbivoría. A pesar de esto, las plántulas sufrieron igualmente la herbivoría y, además, las jaulas se cubrieron de epífitos, lo que disminuyó la luz incidente, y dificultó aún más la supervivencia (Fig. I.9E-F). En 4 meses la mayoría de las plántulas habían muerto o desaparecido.

En la Tabla I.15 se muestran los resultados obtenidos del seguimiento llevado a cabo para la 1ª experiencia de trasplante (agosto 2006), durante los meses que permanecieron las plántulas con vida. En la 2ª experiencia (marzo 2007), las plántulas no sobrevivieron más de dos meses, por lo que no se tomaron datos de crecimiento.

Tabla I.15. Datos de los diferentes parámetros medidos y tasas de crecimiento de las plántulas en el mar para la primera experiencia de trasplante (agosto 2006); obtenidas en intervalos de 60 días.

	Agosto	Octubre	Diciembre
Nº de plantas medidas	30	80	82
Longitud hojas (cm)	29.9 ± 2.1	13.1 ± 0.4	13.8 ± 0.3
Nº hojas	4.2 ± 0.2	2.4 ± 0.1	2.5 ± 0.1
Nº haces	1.16 ± 0.07	1.22 ± 0.05	1.30 ± 0.05
Tasa Longitud Foliar (cm d ⁻¹)	-	-0.28	0.012
Tasa Emisión Foliar (nº hojas d ⁻¹):	-	-0.029	0.001
Tasa Emisión Haces (nº haces foliares d ⁻¹):	-	0.001	0.001

Observamos, para la primera experiencia, una disminución inicial de la longitud foliar, pasando de 29.9 ± 2.1 cm en el momento del trasplante a 13.1 ± 0.4 cm en el segundo mes. Igualmente disminuyó el número de hojas, pasando de 4.2 ± 0.2 a 2.4 ± 0.1 y 2.5 ± 0.1 en los meses siguientes. Esto se refleja en las tasas de crecimiento foliar y de emisión de hojas, que son negativas en el primer intervalo de tiempo. La fuerte afección de herbívoros, a pesar de la protección con jaulas, debilitó mucho las plántulas que no superaron la etapa del invierno, más desfavorable para el crecimiento.

I.5. DISCUSIÓN CAPÍTULO I



I.5.1. Anatomía de la germinación en la especie *Cymodocea nodosa*.

La puesta a punto de la técnica de germinación y cultivo *in vitro* nos ha permitido la observación y descripción detallada de los acontecimientos que acompañan a la germinación y a la formación de la plántula, tanto a nivel macroscópico como microscópico. Es de destacar que la bibliografía precedente reconstruye los sucesos que ocurren durante la germinación en base al material vegetal recolectado de la naturaleza o a descripciones macroscópicas no sustentadas en estudios histológicos (Caye & Meinesz, 1986; Reyes & Sansón, 1994). Nuestro trabajo puede ser, por lo tanto, el primero que aporte datos en este sentido.

De forma general, la germinación puede definirse como una serie de eventos metabólicos y morfogenéticos que tienen como resultado la transformación del embrión en una plántula adulta capaz de mantenerse por si sola (Barceló-Coll *et al.*, 2001). Existen dos términos generalmente empleados para describir la germinación en las plantas: germinación hipogea y epigea. Según Tillich (2007), en las plantas monocotiledóneas estos términos hacen referencia únicamente a la posición de la semilla en relación a la superficie del suelo durante la germinación. Así, en la germinación hipogea, la semilla permanece enterrada en el sedimento, como ocurre en las semillas de *Cymodocea nodosa*.

En *Cymodocea nodosa*, las semillas sin germinar presentan embriones completamente desarrollados formados por el cotiledón, el hipocotilo y un meristemo apical o plúmula (SAM o *Shoot Apical Meristem*), el cual desarrollará posteriormente los haces y rizomas (Fig. I.11A). Por otra parte, no se observa todavía un tejido vascular ni radicular aparentemente desarrollado. Describimos el hipocotilo como el tejido embrionario que ocupa la mayor parte de la semilla, triangular y de color blanquecino (Figs. I.10D y I.11B). Comúnmente se relaciona el tejido blanco de la semilla con el endospermo (tejido triplode, 3n), procedente de la unión de uno de los núcleos del gametofito masculino (haploide) con los dos núcleos polares del gametofito femenino (cada uno de ellos haploide) (doble fertilización en angiospermas). Sin embargo, varios autores relacionados con fanerógamas marinas, citan este tejido blanco como parte del embrión, denominándolo hipocotilo (tejido diploide, 2n). Según Tillich (2007), en las especies acuáticas monocotiledóneas, pertenecientes al orden Alismatales, el hipocotilo suele convertirse en el órgano de reserva de los embriones. Watson & Dallwitz (1992) y Ackerman (2006), mencionan que las semillas maduras de la familia Cymodoceae no

son endospermicas, ya que conforme madura el embrión el endospermo se reabsorbe. Por otra parte, el hipocotilo puede servir no sólo para almacenar sustancias de reserva, sino también para orientar y estabilizar la planta en el sedimento (Ackerman, 2006; Kuo & den Hartog, 2006). En nuestras preparaciones histológicas, observamos cómo el centro del hipocotilo está formado por un conjunto de células compactas, cargadas de sustancias de reserva, que se van a emplear como la principal fuente de nutrientes para la germinación y el desarrollo de la plántula (Fig. I.11B).

Existen varios trabajos en los que se hace una descripción histológica y detallada de las semillas de distintas especies de fanerógamas marinas como *Halophila spinulosa* (Birch, 1981), *Halophila engelmannii* (Jewett-Smith & McMillan, 1990), *Halophila ovalis* (Kuo & Kirkman, 1992), *Halophila beccarii* (Zakaria *et al.*, 1999), *Halodule* (Bragg & McMillan, 1986), *Thalassodendron pachyrhizum* (Kuo & Kirkman 1987, 1990), *Thalassia hemprichii* (Kuo *et al.*, 1991), *Amphibolis griffithii* y *Amphibolis antarctica* (Kuo & Kirkman, 1990), *Phyllospadix iwatensis* y *Phyllospadix japonicus* (Kuo *et al.*, 1990), *Posidonia oceanica* (Belzunce *et al.*, 2005), *Posidonia australis*, *Posidonia sinuosa* y *Posidonia coriacea* (Kuo & Kirkman, 1996); *Zostera noltii* (Loques *et al.*, 1990), *Zostera marina* (Taylor, 1957a, 1957b) o *Cymodocea rotundata* (McMillan *et al.*, 1982).

En esencia, la anatomía de las semillas de *Cymodocea nodosa* se asemeja a la de otras fanerógamas marinas, con determinadas particularidades propias de cada familia y especie. Se observa de forma común en la descripción de todas las semillas, la interpretación del hipocotilo como el tejido de reserva al que se unen la plúmula y el cotiledón. Las semillas del género *Posidonia* (Kuo & Kirkman, 1996; Belzunce *et al.*, 2005), se caracterizan por presentar, al igual que *C. nodosa*, un hipocotilo largo con almidón como la sustancia principal de reserva, y que ocupa prácticamente toda la semilla. Sin embargo, y a diferencia de *Cymodocea*, se observa en las semillas de *Posidonia* un sistema vascular muy bien definido para transportar estas sustancias de reserva, una plúmula muy desarrollada, y un sistema de raíces primarias que permite la fijación al sustrato. En *Phyllospadix* (Kuo *et al.*, 1990), el embrión, que se encuentra en medio del hipocotilo, es recto y simple, con una plúmula que contiene tres primordios foliares y un par de primordios radiculares rodeados por el cotiledón. Las especies del género *Halophila* presentan, por lo general, un cotiledón enrollado protegiendo los primordios foliares (Birch, 1981; Jewett-Smith & McMillan, 1990; Kuo & Kirkman, 1992; Zakaria *et al.*, 1999). En este género, el hipocotilo consiste en numerosas células

parenquimatosas uniformes, que contienen paquetes de almidón, proteínas y lípidos como nutrientes de almacenamiento (Kuo & Kirkman, 1992). Estas semillas presentan una pequeña zona de células meristemáticas en la zona basal y final del hipocotilo, que probablemente funcionan como radícula que se elonga en la fase inicial de la germinación (Kuo & Kirkman, 1992). En el género *Thalassia* se distinguen igualmente un hipocotilo que ocupa la mayor parte de la semilla, fusionado con un cotiledón y un embrión insertado en la base. El embrión contiene la plúmula con hojas desarrolladas y un par de primordios radiculares (Kuo *et al.*, 1991). El hipocotilo de *Cymodocea nodosa*, al igual que en *C. rotundata* (McMillan *et al.*, 1982), permanece dentro de las paredes de la semilla, y la cresta dorsal sirve como dispositivo de anclaje al sustrato. De forma general observamos que las reservas en las semillas de fanerógamas marinas son utilizadas desde la periferia y la zona basal hacia el centro del hipocotilo, como por ejemplo en los géneros *Posidonia*, *Halophila* y *Phyllospadix* (Kuo *et al.*, 1990; Kuo & Kirkman, 1992, 1996). Al igual que en *Posidonia* (Kuo & Kirkman, 1996), el hipocotilo de las semillas de *C. nodosa* va a permanecer unido a la plántula durante varios meses sirviendo como material de reserva para la nutrición de la plántula.

Observamos, por otra parte, que existen diferencias en la descripción de las semillas de *Cymodocea nodosa* respecto a otras especies de la familia Cymodoceae. Es el caso de las semillas del género *Siringodium* (Cymodoceae) que presentan un embrión con una radícula reducida adyacente a un gran hipocotilo (Kuo & den Hartog, 2006). Las semillas del género *Halodule* (Cymodoceae) también muestran un embrión formado por una pequeña radícula situada junto a un hipocotilo oblongo, compuesto por células largas y poligonales que contienen granos de almidón, al que se unen la plúmula y el cotiledón incorporados en una invaginación (Bragg & McMillan, 1986). En las preparaciones histológicas de *C. nodosa* no se observa en ningún caso la presencia de una radícula, al igual que en las semillas de *C. rotundata* que, según McMillan *et al.*, (1982), están formadas por el hipocotilo al que se unen la plúmula y el cotiledón.

La ausencia de un tejido vascular en las semillas de *Cymodocea nodosa* se detalla también para otras especies del género *Halodule* o *Cymodocea* (McMillan *et al.*, 1982; Bragg & McMillan, 1986). En especies del género *Phyllospadix*, *Thalassia* o *Posidonia* (Kuo *et al.*, 1990, 1991; Kuo & Kirkman, 1996; Belzunce *et al.*, 2005), sin embargo, las semillas presentan un tejido vascular bien definido para transportar las sustancias de reserva.

La germinación en *Cymodocea nodosa* se caracteriza por la apertura de la cresta dorsal y la emergencia del cotiledón (Fig. I.12A). En este momento el cotiledón es blanco y cilíndrico (Fig. I.12B), y continúa su crecimiento hasta que una vez superado el sustrato se vuelve verde, entre los días 10 y 15 (Fig. I.12C), adquiriendo capacidad fotosintética. De las secciones histológicas realizadas a la plántula recién germinada, podemos determinar cómo el crecimiento del cotiledón es fundamentalmente por elongación celular más que por crecimiento meristemático localizado, debido a que el ápice del cotiledón está formado por células muy alargadas y vacuolizadas (Fig. I.13A-C). El cotiledón crece hasta alrededor del día 20 (Fig. I.12D), arrastrando consigo el meristemo foliar o *Shoot Apical Meristem* (SAM). A partir de este momento el cotiledón no va a crecer más, y permanecerá en la plántula durante varias semanas. A lo largo de todo el cotiledón se diferencian claramente una epidermis, un parénquima de células cargadas de sustancias de reserva y un sistema vascular central (Fig. I.14A-C). En la base del cotiledón de la plántula germinada observamos, ahora ya, un meristemo radicular desarrollado (RAM o *Root Apical Meristem*) con células cargadas de sustancias de reserva, que se van alargando y compactando (Fig. I.16A-D), y desarrollarán las dos primeras raíces que nacen de forma opuesta (raíces primarias o seminales) (Fig. I.12E). En la zona intermedia del cotiledón se sitúa el meristemo foliar o *Shoot Apical Meristem* (SAM), formado por células meristemáticas cargadas de sustancias de reserva de tipo almidón, y conectado con el meristemo radicular por medio de un sistema de haces vasculares (Fig. I.15A-C). A partir de este punto se desarrolla la primera hoja alrededor del día 25 (Fig. I.12E), y la segunda a partir del día 30, con la consiguiente formación del primer haz, y se desarrollan nuevas raíces seminales en la base del primer entrenudo (Fig. I.12F). El día 35-40 es ya una plántula desarrollada con un haz, 2-3 hojas y varias raíces seminales (Fig. I.12G).

En lo que se refiere a las descripciones de eventos macroscópicos durante la germinación, nuestros datos coinciden con las descripciones de otras especies de fanerógamas marinas, donde, por lo general, la germinación comienza con la emergencia del cotiledón o primordios foliares en la parte apical del hipocotilo y con la emergencia de la radícula en la parte basal (Birch, 1981; McMillan, 1981, 1987, 1988; Bragg & McMillan, 1986; Jewett-Smith & McMillan, 1990; Kuo & Kirkman, 1992; Zakaria *et al.* 1999). En el caso de *Posidonia oceanica*, debido a que las semillas presentan unas raíces iniciales bien establecidas (Belzunce *et al.*, 2005), emergen directamente las raíces primarias (Belzunce *et al.*, 2008). En *Phyllospadix* no se

describe la emergencia de la radícula, aunque sí de primordios radiculares que no emergen hasta 6 meses después de haberse iniciado la germinación (Kuo *et al.*, 1990). Esto implica que las reservas del hipocotilo no sirven para la producción de las raíces, sino que éstas emplean las que producen las hojas ya maduras. *Zostera noltii* tampoco inicia la germinación con la emergencia de la radícula, sino directamente emerge el cotiledón, y no es hasta que se ha desarrollado la tercera hoja cuando emergen las raíces primarias (Loques *et al.*, 1990). También en *Siringodium filiforme* se desarrollan directamente las raíces adventicias a partir del nodo cotiledonario (McMillan, 1981). En la descripción de la germinación de la especie *Zostera marina* tampoco se menciona el desarrollo de la radícula (Churchill, 1983, 1992). En varias especies, principalmente del género *Halophila*, se desarrollan, en el inicio de la germinación, pelos unicelulares desde la superficie del hipocotilo, para favorecer el anclaje de la plántula (Birch, 1981; McMillan, 1987, 1988; Jewett-Smith & McMillan, 1990; Kuo & Kirkman, 1992; Zakaria *et al.* 1999). En el caso de *Cymodocea nodosa* no se observa ni la formación de pelos unicelulares ni la emergencia de la radícula.

El estudio histológico de la plántula desarrollada nos ha permitido, por otra parte, determinar los tejidos vegetales susceptibles de ser empleados en el cultivo *in vitro*. Así, el SAM y el RAM se corresponden con tejidos meristemáticos que poseen células jóvenes y en división, que emplearemos, como veremos en el Capítulo III, como explantos con posibilidad de generar respuestas morfogénicas *in vitro* (organogénesis u embriogénesis somática).

1.5.2. Efecto del tratamiento hiposalino en la imbibición de las semillas de *Cymodocea nodosa*.

La toma de agua por parte de la semilla es lo que se conoce como imbibición, y es el primer evento que tiene lugar durante la germinación. La imbibición es un proceso físico y no depende de la viabilidad de las semillas, que se imbiben igual estando vivas o muertas. Durante la imbibición, las moléculas de agua penetran al interior de la semilla provocando un hinchamiento y un aumento en el peso fresco de la misma. Esto provoca que se dispersen los coloides, necesario para la vuelta a la vida activa, rehidrata las reservas alimenticias para transformarlas en asequibles al embrión, y se activan los enzimas responsables de la hidrólisis de las sustancias de reserva (Barceló-Coll *et al.*, 2001). El proceso de imbibición, según estos autores, consta de tres fases:

- Fase I. Absorción de agua por la diferencia de potencial hídrico (el potencial hídrico de la semilla no excede de -1 a -1.5 MPa). Perturbación de las membranas y salida de solutos y metabolitos de bajo peso molecular.

- Fase II. Se dan los principales acontecimientos metabólicos que conducen a la emergencia de la radícula en semillas no durmientes. Las semillas durmientes son también metabólicamente activas en esta fase. Sólo las semillas aptas para germinar entran en la tercera fase.

- Fase III. Elongación de la radícula acompañada de una nueva absorción de agua.

La imbibición depende, a su vez, de tres factores:

- 1) La composición química de la semilla: las semillas ricas en proteínas absorben mucha agua y las oleaginosas menos.
- 2) La permeabilidad de la envuelta seminal.
- 3) La disponibilidad de agua en el medio ambiente.

Es de destacar, que el proceso de la imbibición y germinación de las semillas está relacionado, además, con el grado de hidratación del embrión. Pammenter & Berjak (2000), basándose en Vertucci & Ferrant (1995), identifican 5 niveles de hidratación en los tejidos de la semilla. Según estos niveles de hidratación, pueden concurrir distintos procesos metabólicos en la semilla debido al cambio en las propiedades termodinámicas del agua. Con altos niveles de agua en el interior de la semilla (Nivel V de hidratación, > 0.7 g/g, gramos de agua/ peso semilla; entre -1 y -1.5 MPa de potencial hídrico), se

presenta un metabolismo normal y la semilla puede germinar. Con niveles de agua algo menores (Nivel IV; 0.45-0.70 g/g; entre -1.5 y -3 MPa) la síntesis de proteínas y ácidos nucleicos, junto con la respiración, es posible, pero no hay agua suficiente para el crecimiento celular ni la germinación. Rangos de 0.25 a 0.45 g/g de agua en la semilla (Nivel III, entre -3 MPa y -11 MPa) no permiten la síntesis de proteínas y ácidos nucleicos, pero puede detectarse algo de respiración. Por debajo de estos niveles, sólo los eventos de bajo nivel catabólico pueden ocurrir (Nivel II; entre -11 MPa y -150 MPa; 0.08-0.25 g/g). En el nivel I el agua permanece unida a las macromoléculas como ocurre en las semillas que sufren deshidratación (Nivel I; <-150 MPa; 0.08 g/g).

Las semillas de *Cymodocea nodosa* pertenecen al tipo de semillas denominadas recalcitrantes (más detalles en el Capítulo II), que se caracterizan por la necesidad de mantener un elevado contenido en agua en su interior para permanecer viables (Obroucheva & Antivopa, 2004). Así, en condiciones normales, las semillas de *C. nodosa* deben situarse en el nivel III de hidratación, según los niveles de hidratación de Pammenter & Berjak (2000), con potenciales hídricos alrededor de -3 ó -4 MPa, ya que el contenido en agua de la semilla de *C. nodosa* es, según Caye *et al.* (1992), alrededor del 35% de su peso (0.35 g de agua/g peso fresco). A pesar de que estas semillas apenas se deshidratan, necesitan un aporte extra de agua para alcanzar el nivel V y germinar.

La entrada de agua en el interior de las semillas se debe exclusivamente a una diferencia de potencial hídrico entre la semilla y el medio ambiente. El tejido que posea un potencial hídrico bajo, tenderá a absorber agua de sus alrededores, siempre que esta agua se halle a un potencial hídrico más elevado. En *Cymodocea nodosa*, la **diferencia de potencial hídrico necesaria para la difusión de agua al interior de la semilla y su imbibición puede estar favorecida por la abundante adquisición de sustancias de reserva (como hemos apreciado en la histología), que hacen disminuir el potencial hídrico del tejido.** En nuestro caso, además, la disponibilidad de agua es abundante ya que se encuentran en ambientes acuáticos. Sin embargo, el hecho de ser un ambiente acuático marino con salinidad de 36.6 psu en aguas Canarias, disminuye su potencial hídrico alrededor de -2.5 MPa (Fig. I.5). Aparentemente, esto impediría crear la diferencia de potencial hídrico necesaria para alcanzar el nivel V de hidratación (entre -1 y -1.5 MPa) y la consiguiente activación del proceso germinativo. En este contexto, la disminución de la salinidad natural del agua de mar, de 36 psu (-2.5 MPa) a 18 psu (-1.27 MPa), provoca la imbibición inmediata de las semillas por diferencia de potencial

hídrico y el paso al nivel V de hidratación. Caye *et al.* (1992) estudiaron la toma de agua en semillas de *C. nodosa* durante la germinación. Según estos autores, debido al elevado contenido en agua de la semilla en condiciones normales (35% del peso fresco), la absorción de la misma durante la germinación, con salinidades tanto de 20 como de 5 psu, es baja (entre un 3 y un 12% respectivamente), lo que únicamente elevaría el contenido en agua de la semilla hasta un máximo de 0.47 g/g (nivel IV de hidratación). Sin embargo, este nivel de hidratación resulta ser suficiente para activar los procesos fisiológicos conducentes a la germinación en las semillas de *C. nodosa*.

Estos resultados indican que la disminución de la salinidad acelera la entrada de agua en la semilla y la consiguiente germinación. Sin embargo, es importante destacar que no son imprescindibles condiciones de baja salinidad para la activación de estos procesos. Así, hemos podido comprobar que la germinación ocurre también con salinidad de 36.6 psu (-2.5 MPa), lo que supone que con una mínima entrada de agua en la semilla por simples procesos físicos (de -3 ó -4 MPa a -2.5 MPa), la semilla es capaz de activar los procesos fisiológicos y metabólicos necesarios para iniciar la germinación.

La disminución de la salinidad en el mar Mediterráneo, como consecuencia de lluvias torrenciales y escorrentías, ha servido para justificar la germinación de las semillas de *Cymodocea nodosa* por algunos autores (Caye & Meinesz, 1986; Caye *et al.*, 1992). Sin embargo, en las Islas Canarias, donde el rango de salinidad va de 36.6 a 36.8 psu a lo largo del año y la presencia de lluvias es escasa, la germinación de las semillas por el efecto de la disminución de la salinidad carece, a nuestro entender, de relevancia ecológica.

1.5.3. Efecto del tratamiento hiposalino en la germinación de semillas de *C. nodosa* y condicionamiento del desarrollo posterior de la plántula.

De los distintos tratamientos de shock hiposalino empleados, fueron los de menor salinidad los que indujeron los más altos porcentajes de germinación. Así, el tratamiento de 5 psu indujo la germinación de forma masiva desde el primer mes (80%). Salinidades de 11 y 18 psu siguieron la misma tendencia, induciendo germinaciones elevadas tras finalizar los tres meses de estudio (76 y 57% respectivamente), mostrando, además, diferencias significativas respecto al control (36 psu = 23%; $p < 0.05$), donde se observan germinaciones más tardías (Tabla I.9). Sin embargo, un buen tratamiento para inducir la germinación no conlleva necesariamente un mejor desarrollo de las plántulas obtenidas. Hemos visto que **el tratamiento hiposalino condiciona el posterior desarrollo de las plántulas**, ya que ninguna semilla germinada con el tratamiento de 5 psu alcanzó el estado 3 de desarrollo y el tratamiento de 11 psu lo limitó con respecto a salinidades más altas (Tabla I.10). La germinación de las semillas y la optimización del desarrollo de la plántula son importantes en proyectos restauración, donde el número de plántulas producidas es un factor importante a tener en cuenta.

En definitiva, considerando tanto el porcentaje de germinación, como el posterior crecimiento hasta el estado 3 de desarrollo, **el mejor tratamiento es el de hiposalinidad a 18 psu** durante el primer mes (subiendo la salinidad a 36 psu en el segundo), en donde todas las semillas germinadas (57.7%) se desarrollan hasta plántula y pasan a la fase de aclimatación (Tabla I.10). En este sentido, Caye & Meinesz (1986), trabajando con semillas de *Cymodocea nodosa*, concluyeron que la forma más adecuada de inducir su germinación y el desarrollo hasta plántula era disminuir la salinidad durante 2-6 días (10 psu) y luego mantenerla a 27 psu durante 20 días más, para obtener porcentajes de desarrollo máximos del 50%. No obstante, estos autores no continuaron con el estudio de crecimiento y desarrollo posterior de las plántulas.

La germinación en el laboratorio mediante tratamientos hiposalinos (18 psu) permite obtener porcentajes de germinación de hasta el 70% en cualquier momento del año, como vemos en los resultados obtenidos cuando el procedimiento es escalado para propagar masivamente (Tabla I.13). Además, en este tipo de especies donde la germinación en la naturaleza es relativamente rara y escasa, **la recuperación de semillas y la inducción de la germinación en el laboratorio mediante tratamientos hiposalinos puede constituir un método efectivo y de bajo coste para la obtención de material vegetal con el que repoblar o restaurar ecosistemas dañados.**

1.5.4. Estudio del crecimiento posterior de las plántulas de *Cymodocea nodosa* germinadas a partir de semillas en el laboratorio y efecto del sistema de cultivo.

Finalmente, en lo que al destino de las plántulas se refiere, observamos un crecimiento positivo de todos los parámetros medidos a lo largo de 8 meses de estudio (Tabla I.16), con tendencia a continuar su desarrollo de forma positiva ya que las plántulas están sanas y fuertes antes de llevarlas al mar. Observamos en el octavo mes el desarrollo inicial del rizoma, alcanzando un valor aproximado de 2 cm de longitud. Las plántulas pueden mantenerse durante largos periodos en los tanques (hasta 6-8 meses) controlando siempre que no degeneren el sedimento o las condiciones de cultivo.

Tabla I.16. Recopilación de diferentes datos de crecimiento (media \pm ee del n° hojas, n° raíces, n° haces, longitud de raíces, longitud foliar y longitud del rizoma en cm) obtenidos en este trabajo en plántulas germinadas en el laboratorio y aclimatadas en acuarios a partir del 2° mes de vida (mes 1, n = 30; mes 2, 3 y 4, n = 20; mes 5, n = 23; mes 8, n = 14). n.d.: no data.

	Mes 1	Mes 2	Mes 3	Mes 4	Mes 5	Mes 8
N° Hojas (n° \pm ee)	1.45 \pm 0.11	2.00 \pm 0.27	4.20 \pm 0.21	4.35 \pm 0.27	n.d.	3.78 \pm 0.30
N° Raíces (n° \pm ee)	1.70 \pm 0.10	1.75 \pm 0.34	4.05 \pm 0.26	4.80 \pm 0.33	n.d.	7.85 \pm 0.90
N° Haces (n° \pm ee)	1.00 \pm 0.0	1.00 \pm 0.00	1.40 \pm 0.11	1.55 \pm 0.13	n.d.	1.14 \pm 0.09
Long. Foliar (cm \pm ee)	4.64 \pm 0.23	7.17 \pm 1.13	22.25 \pm 1.44	28.73 \pm 1.38	34.57 \pm 0.91	47.09 \pm 2.12
Long. Raíces (cm \pm ee)	0.91 \pm 0.17	2.10 \pm 0.58	7.46 \pm 0.65	8.11 \pm 0.64	n.d.	34.8 \pm 6.19
Long. Rizoma (cm \pm ee)	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	2.46 \pm 0.23

Nuestros resultados pueden ser comparados con los de Pirc *et al.* (1986) y Buia & Mazzella (1991), que estudiaron el crecimiento en el laboratorio de las plántulas de *Cymodocea nodosa* germinadas *in vitro*.

Pirc *et al.* (1986) recogieron semillas en noviembre, y permanecieron en estado de dormancia 7-8 meses, tras lo cual empezaban a germinar en mayo. Alcanzaron unos índices de germinación en el laboratorio con agua de mar a temperatura ambiente del 100% en julio. El máximo de producción de hojas y raíces se alcanzó en julio, con 3.84 \pm 0.90 hojas y 3.43 \pm 0.90 raíces por plántula, y el máximo de longitud foliar en agosto con 11.87 \pm 3.89 cm. Sin embargo, a partir de este momento los valores disminuyen y las plántulas terminan muriendo en septiembre, no sobreviviendo por más de 4 meses.

Pirc *et al.* (1986) estudiaron también la germinación y el crecimiento de las plántulas en la naturaleza. Observaron que el número máximo de raíces y la longitud máxima foliar se obtiene en julio con 2.25 \pm 1.55 raíces y 7.65 \pm 2.97 cm

respectivamente, y el número máximo de hojas se da en agosto con 3.08 ± 3.76 hojas por plántula. La mortalidad fue igualmente elevada en la naturaleza, y el 50% de las plántulas germinadas en junio se perdieron en agosto, por lo que no continuaron el estudio de crecimiento.

En el trabajo de Buia & Mazzella (1991), tras recolectar semillas de *Cymodocea nodosa* en enero, obtuvieron unos porcentajes de germinación en junio de entre 60 y 90%. Observaron el crecimiento de las plántulas en el laboratorio desde junio hasta agosto. En este periodo las plántulas producían hojas y raíces, pero finalmente morían y no continuaban su crecimiento. Las plántulas tuvieron un crecimiento positivo de junio a agosto, hallándose máximos de longitud foliar y de número de hojas en julio, que variaban según la pradera de origen entre 15 y 25 cm, y entre 3 y 4 hojas por plántula. El crecimiento de la raíz alcanzó su máximo en agosto con hasta 4 raíces por plántula y 6 cm de longitud.

En los estudios llevados a cabo por Pirc *et al.* (1986), tanto en el laboratorio como en la naturaleza, y por Buia & Mazzella (1991), las plántulas tienen un crecimiento positivo durante dos meses y empiezan a decaer a partir del tercer mes, lo que lleva a la muerte de las plántulas en el cuarto mes. Sin embargo, en nuestro estudio, las plántulas de *Cymodocea nodosa* tienen un crecimiento positivo y permanecen saludables por periodos mucho más prolongados, como hemos visto en la Tabla I.16 (hasta 8 meses en tanques). Aparentemente, la única diferencia entre estos estudios y el nuestro deben de ser las condiciones de cultivo a las que han sido sometidas las semillas. Así, Buia & Mazzella (1991) mantienen las semillas en acuarios con flujo continuo de agua de mar a temperatura y luz ambiente. Pirc *et al.* (1986) las mantienen en acuarios con arena procedente del lugar de recolección y flujo continuo de agua de mar a temperatura ambiente y luz adicional con fluorescentes (GRO-LUX F 36 W) y fotoperiodo de 14:10 día/noche. **Los sistemas de cultivo empleados en nuestro estudio:** recipientes tipo magenta con arena, medio de cultivo PES y agua de mar durante un periodo de 45-60 días ($24 \pm 2^\circ\text{C}$, fotoperiodo 18:6 y $30 \mu\text{moles de fotones m}^{-2} \text{s}^{-1}$), y posteriormente en acuarios o tanques de cultivo con arena y flujo continuo de agua de mar, temperatura ambiente (entre 18° y 24°C) y rangos de luz entre 30 y 200 $\mu\text{moles de fotones m}^{-2} \text{s}^{-1}$, **permiten un desarrollo continuado de las plántulas, llegando a desarrollar rizomas ortotrópicos necesarios para la supervivencia de la plántula y la formación de nuevas praderas.**

1.5.5. Necesidad de aclimatación de las plántulas de *Cymodocea nodosa* germinadas en condiciones in vitro.

Se asume que el crecimiento de las plántulas en el acuario va a permitirles la adquisición de los recursos necesarios para mejorar la supervivencia en el medio natural, incrementando el desarrollo de la parte aérea para realizar la fotosíntesis y de la parte subterránea para poder nutrirse y fijarse al sustrato. El aumento de la biomasa foliar y radicular resulta esencial para adaptarse a las nuevas condiciones del medio natural donde existe una mayor inestabilidad por las fuertes corrientes, la herbivoría y la menor disponibilidad de luz y nutrientes. El tiempo que van a permanecer en la fase de aclimatación dependerá de la propia capacidad de la plántula para crecer y adquirir biomasa suficiente para el trasplante. Debido a las condiciones especiales a las que están sometidas las plántulas durante la fase del cultivo *in vitro*, se pueden obtener individuos con anormalidades fisiológicas, morfológicas, y anatómicas, las cuales deben ser corregidas para la supervivencia de los trasplantes (Pospisilova *et al.*, 1998). Los esfuerzos en este sentido se centran en mejorar la supervivencia de las plántulas en el mar mediante la aclimatación previa a las condiciones *ex vitro*. Por otra parte, la necesidad de aclimatar plántulas se hace patente con los futuros requerimientos de ejemplares en cualquier época del año, siendo necesaria la creación de espacios donde crezcan y se desarrollen satisfactoriamente, de manera que estén siempre disponibles para ser empleadas en eventuales proyectos de restauración y trasplante.

La aclimatación en fanerógamas marinas es especialmente importante para el desarrollo de un sistema radicular que sea capaz no sólo de adquirir los nutrientes necesarios, sino también de estabilizar las plántulas en el sedimento (Woodhead & Bird, 1998). Bird & Jewett-Smith (1994) llevaron a cabo experimentos de aclimatación *ex vitro* con fragmentos de rizoma de *Halophila engelmannii* propagados *in vitro*. Emplearon acuarios con arena y flujo continuo de agua de mar, cubiertos por una malla para reducir la luz solar en un 50%, y tras 6 semanas de cultivo observaron un aumento en la producción de raíces y un 100% de supervivencia.

La importancia de la aclimatación se hace evidente, también, en algunos trabajos de trasplante con distintas especies de fanerógamas marinas, como en los experimentos llevados a cabo por Meinesz *et al.* (1993), donde mencionan que los trasplantes de *Posidonia oceanica*, que han crecido previamente en acuarios durante varios meses, sobreviven mejor que los trasplantados directamente. Bird *et al.*, (1994) llevaron a cabo

dos experimentos de trasplante con plantas de *Ruppia maritima* cultivadas *in vitro*. El primer método empleado fue el de los *staples* o grapas, y las plantas no sobrevivieron al primer mes. En el segundo método, las plantas fueron aclimatadas en acuarios con sistemas de flujo abierto durante 6 semanas. Estos trasplantes mostraron unos índices de supervivencia entre 20 y 80% tras 11 meses, además de un aumento considerable del número de haces y de la cobertura. Posteriormente, Woodhead & Bird (1998), aprovechando las técnicas de micropropagación clonal desarrolladas para cultivar *R. maritima* (Koch & Durako, 1991; Bird *et al.*, 1993, 1996), desarrollaron un protocolo para acelerar la producción de las raíces de esta especie en cultivo, al mismo tiempo que aclimataban las plántulas a las condiciones *ex vitro*. Reportaron que los cultivos de *R. maritima* eran fotosintéticamente inactivos en medios que contenían sacarosa, pero eran capaces de volverse autótrofos inmediatamente de ser transferidos a medios bicarbonatados. Conforme aumentaba la concentración de nutrientes la planta respondía aumentando el número de nodos y de raíces. Además, las plantas aclimatadas en acuarios permanecían saludables lo que indicaba la necesidad de un sistema de flujo continuo. Concluyeron que esta especie puede aclimatarse de manera fácil y efectiva con un coste bajo, convirtiéndola en una especie muy útil para proyectos de restauración y mitigación.

Las plántulas de *Cymodocea nodosa* germinadas *in vitro* se aclimatan bien al transferirlas de los recipientes de cultivo (MagentaR-G7; Sigma Co.USA), donde han permanecido entre 45 y 60 días desde la puesta en germinación, a los acuarios o tanques de cultivo, independientemente de la época del año, con porcentajes de supervivencia cercanos al 100%. En vista de las tasas de crecimiento obtenidas (Tablas I.11, I.14 y I.16) y la apariencia saludable del material vegetal durante la aclimatación, suponemos que el rango de condiciones lumínicas (entre 30 y 200 $\mu\text{moles de fotones m}^{-2} \text{s}^{-1}$) y el de temperaturas alcanzadas (entre 18 y 24°C, relativamente constantes en aguas del Archipiélago Canario), resultan apropiadas para la misma. La arena empleada (arena de obra) y el flujo de entrada de agua de mar no han resultado ser factores críticos. Por el contrario, se debe tener un especial control del potencial redox del sedimento arenoso, ya que cuando éste alcanza valores de hasta -300 mV (medido con sensor combinado de Ph / Potencial redox marca Crison 507, mediante un electrodo de Pt, crison 52-61), se observa una disminución de la vigorosidad de la plántula, las hojas se vuelven marrones y se llenan de epífitos, hasta que se caen y finalmente la plántula muere.

Del estudio de aclimatación también se deduce que la tasa de crecimiento en el tiempo no es lineal (Fig. I.18), con un periodo de crecimiento máximo entre los días 15 y 30, excepto para la emisión de raíces que es mayor durante los 15 primeros días. En el primer periodo, el crecimiento es en general menor, debido posiblemente a que las plantas requieren un tiempo para aclimatarse a las nuevas condiciones. A partir de los 30 días en cultivo, el crecimiento se estabiliza y las tasas de crecimiento disminuyen ligeramente. Esto nos permite establecer el momento óptimo de trasplante, y situarlo a partir del día 30 de aclimatación, donde las plántulas presentan una media de 4.20 ± 0.21 hojas y 4.05 ± 0.26 raíces y una longitud foliar y radicular de 22.25 ± 1.44 cm y 7.46 ± 0.65 cm respectivamente. Las plántulas aclimatadas estabilizan su crecimiento, y en 30 días se observan sanas y preparadas para el trasplante al medio natural con un rendimiento del 100% de las plántulas cultivadas.

Atendiendo a las tasas de crecimiento absolutas (Tabla I.11) observamos que la plántula dedica mayor esfuerzo al desarrollo de la parte aérea en relación al desarrollo de la parte radicular (0.479 ± 0.027 cm d⁻¹ de la hoja frente a los 0.132 ± 0.017 cm d⁻¹ de la raíz, obteniéndose una ratio de crecimiento de 3.6 hojas/raíces). El término *correlación de crecimiento* se usa para designar al tipo de crecimiento que implica interdependencia entre el desarrollo de distintas partes de una planta (Barceló-Coll *et al.*, 2001). Por ejemplo, conforme el tallo crece en longitud por el efecto del crecimiento del meristemo apical, también se engruesa, aumentando la rigidez de las zonas más viejas. A su vez, este aumento de la longitud del tallo implica un incremento en las necesidades de agua y nutrientes y, para satisfacerla, se equilibra con el crecimiento del sistema radicular, lo cual también significa un aumento en las necesidades de sustancias orgánicas que debe aportar el tallo. De esta manera, durante toda la vida de la planta hay un continuo transporte de solutos de una parte a otra, existiendo unos órganos productores (*sources*) y otros consumidores. Retomando los datos de la Tabla I.11, en vista de las diferencias entre el crecimiento de la parte aérea y parte radicular de las plántulas de *Cymodocea nodosa*, nos planteamos intervenir en el programa de crecimiento de la planta para mejorar la relación crecimiento hoja/raíz, de forma que promovamos un mejor agarre y capacidad de supervivencia del material vegetal a la hora del trasplante. Este aspecto será tratado con detalle en el Capítulo II.

1.5.6. El trasplante al mar de plántulas de *Cymodocea nodosa* germinadas en el laboratorio y aclimatadas en tanques de cultivo.

De los diferentes ensayos de trasplante, en los que se ha determinado tanto la supervivencia como las tasas de crecimiento de las plántulas (Fig. I.20, I.21; I.22; Tabla I.12) hemos podido valorar los diferentes factores que pueden afectar al trasplante, entre ellos el método de anclaje de las plántulas al sustrato, la época de trasplante, la afección por herbivorismo, la densidad de siembra o el uso directo de plántulas sin aclimatar.

Uno de los mayores problemas para la supervivencia de las plántulas es, según varios autores, la escasa fijación al sustrato y la pérdida por fuertes corrientes, lo que hace necesario adoptar métodos de anclaje que permitan aumentar la supervivencia. Meinesz *et al.* (1993) llevaron al mar 20 plántulas de *Posidonia oceanica* germinadas en acuarios y cultivadas durante 14 meses. Tuvieron un 80% de pérdidas tres años después del trasplante, lo que atribuyeron al mal anclaje de las mismas. Según Woodhead & Bird (1998), el mejor método para trasplantar plántulas de *Ruppia maritima* es en esteras de fibra de coco donde han sido aclimatadas previamente, ya que, además de mejorar el anclaje, les permiten extenderse y crecer fuera de las mismas. Kirkman (1998) también empleó un tipo de sujeción al sustrato para sembrar plántulas de *Amphibolis*, denominado geotextile. Las plántulas parecían sanas los primeros meses pero terminaron muriendo antes de cumplir 1 año. Observó que el recipiente empleado no era un buen sustrato para esta especie porque las raíces y rizomas no podían emerger fuera del plástico. Según este autor, la siembra de estas plántulas en el medio natural requiere, además de mucha protección, zonas de escasa corriente y un buen anclaje al sustrato. Kirkman (1998) también llevó a cabo un experimento de trasplante con plántulas de varias especies de *Posidonia* en diferentes áreas y empleando diversos métodos de anclaje: libres, en Jiffy Pots (recipientes biodegradables) y en Growool blocks (recipiente de piedra de con revestimiento de plástico). El mejor método fue el de Growool blocks aunque no lo recomienda para restaurar praderas de *Posidonia*, ya que, aunque las hojas crecen y aparecen nuevas, los rizomas se propagan escasamente, mostrando un crecimiento de 1-2 mm tras un periodo de tres años. Balestri *et al.* (1998) obtuvieron cierto éxito en un experimento de trasplante llevado a cabo con plántulas de *P. oceanica* crecidas en acuarios durante dos meses. Las llevaron al mar fijadas a mallas de plástico con hilo de nylon y consiguieron altos porcentajes de supervivencia (70%) tres años después del trasplante. Estos resultados indican que las plántulas de *P.*

oceanica pueden ser empleadas para la restauración del área concreta de este estudio, en el mar de Liguria (Mediterráneo, Italia). Más recientemente, en Australia, Seddon *et al.* (2004) y Wear *et al.* (2006) han empleado recipientes biodegradables con las especies *Posidonia* spp. y *Amphibolis* sp., para solucionar igualmente los problemas de anclaje al sustrato y facilitar el reclutamiento natural de las plántulas.

En las distintas experiencias de trasplante llevadas a cabo a lo largo de este estudio con plántulas de *Cymodocea nodosa* germinadas *in vitro*, hemos comprobado que la fijación al sustrato no es un factor determinante para la supervivencia de éstas plántulas. En concreto, la zona de Taliarte en la que se han realizado los trasplantes (Fig. I.3B), caracterizada por un bajo hidrodinamismo debido a la protección de un muelle, permite la permanencia de las plántulas aunque sean trasplantadas sin ningún método de anclaje (68.5% de supervivencia 9 meses después del trasplante, Fig. I.22A). Por otro lado, parece un hecho probado que atar las plántulas con hilo de bala o cuerdas a las mallas para evitar su desprendimiento, además de resultar innecesario, provoca efectos dañinos en las plántulas que pueden ser la principal causa del debilitamiento y muerte final, por lo que desaconsejamos su uso (Fig. I.20 y I.21: Tablas I.12 y I.15). Nueve meses después del trasplante con distintos métodos de anclaje, las plántulas sin ningún método de fijación sobreviven mejor (68.5%) que las atadas a mallas de nylon (0%) o las trasplantadas sobre recipientes biodegradables (32%) (Fig. I.22A).

Otro de los factores estudiados en varios trabajos es la afeción de las praderas de fanerógamas marinas por el herbivorismo (Cebrián & Duarte, 1998; Valentine & Heck, 1999; Tomas *et al.*, 2005; Heck & Valentine, 2006; Prado *et al.*, 2007) y cómo estas plantas desarrollan mecanismos para su defensa (Verges *et al.*, 2007, 2008). Los cambios que ocurren en las plantas como consecuencia del herbivorismo son conocidos como respuestas inductivas, y hacen referencia a la adquisición de tolerancia o de mecanismos de defensa (Verges *et al.*, 2008). Considerando que el herbivorismo en sistemas acuáticos es tres veces mayor que en sistemas terrestres, las plantas deben desarrollar mecanismos de compensación a la biomasa perdida y otros que reduzcan la preferencia de los herbívoros, como la producción de metabolitos secundarios (Verges *et al.*, 2008). Estos autores comprobaron que las plantas de *Posidonia oceanica* tienen capacidad para inducir un crecimiento compensatorio (de número de hojas por haz y crecimiento foliar) tras ser afectadas por bajos niveles de herbivorismo, aunque no observaron incremento en la concentración de compuestos fenólicos. Al mismo tiempo, concluyeron sobre la importancia de la acumulación de N en los rizomas, que, gracias a

su posterior traslocación, la planta puede mantener los niveles de crecimiento y fotosíntesis para compensar los ataques moderados o elevados de los herbívoros.

El principal herbívoro consumidor de las praderas de *Posidonia oceanica* es el espárido *Sarpa salpa*, responsable del 70% de las pérdidas anuales (dándose el 80% en el mes de agosto), y el erizo *Paracentrotus lividus* responsable del otro 30% (Prado *et al.*, 2007). Tanto Balestri *et al.* (1998) como Kirkman (1998) observan que los trasplantes de plántulas de *Posidonia* se ven afectados por el herbivorismo. En concreto, un año después del trasplante llevado a cabo por Kirkman (1998), la mayoría de las plántulas habían muerto y se observaba un mayor epifitismo en las plántulas trasplantadas y un mayor número de hojas comidas que en la pradera natural. Hughes *et al.* (2000) plantean la hipótesis de que los trasplantes de *Zostera noltii* se ven afectados por la infauna, particularmente por el poliqueto *Nereis diversicolor*. Los trasplantes protegidos con redes del efecto de los poliquetos presentan tasas de supervivencia mayores, un menor grado de afección de raíces y una mayor biomasa al final del experimento en comparación con los trasplantes no protegidos.

En las Islas Canarias no existen trabajos sobre la depredación de herbívoros en las praderas de *Cymodocea nodosa*. Mena *et al.* (1993) realizan un estudio sobre la ictiofauna presente en las praderas de *C. nodosa* del Archipiélago Canario. De los peces que según estos autores pueden encontrarse en las praderas de forma permanente u ocasional no se reconoce ningún herbívoro estricto. La mayoría son carnívoros y algunos omnívoros que pueden incluir algas en su dieta como *Sparisoma cretense*, *Spondyllosoma cantharus*, *Oblada melanura*, *Sarpa salpa*, *Canthigaster rostrata*, *Sphoeroides spengleri* y juveniles de *Diplodus sargus cadenati* y *Pagellus acarne* (González-Jiménez *et al.*, 1997). Así, es más probable que las praderas de *C. nodosa* en Canarias se vean afectadas por invertebrados tipo moluscos o equinodermos, aunque no existen estudios al respecto. Aun así, creemos que el herbivorismo ha sido un factor determinante en la supervivencia de nuestros trasplantes, que se hace patente en cada experiencia, ya que a pesar del empleo de jaulas (Fig. I.9F) se observan las hojas mordidas y en muchas ocasiones sólo permanece la vaina enterrada y protegida por la arena (Fig. I.23C-E). Esto debilita mucho a las plántulas que permanecen con vida durante algunos meses, pero no consiguen sobrevivir por largos periodos y finalmente acaban muriendo como vemos en los diferentes gráficos de supervivencia (Fig. I.21). Además, la mortalidad se acentúa a partir de los meses de octubre y noviembre, y ninguna plántula trasplantada con mallas sobrevive en diciembre. El mal estado de las

plántulas, carentes de parte aérea, les impide superar las etapas más desfavorables de crecimiento que se dan en todas las praderas de forma natural durante el invierno.

Como ya hemos mencionado, las fanerógamas marinas presentan una serie de ventajas en su fisonomía, que favorecen la adquisición de la tolerancia y del crecimiento compensatorio, como la presencia de meristemas basales inaccesibles, la propagación clonal, y la integración fisiológica entre *ramets* (Verges *et al.*, 2008 y referencias contenidas en este artículo). Sin embargo, nuestras plántulas son todavía muy jóvenes y están más indefensas ante la herbivoría por carecer precisamente de una parte importante de estas ventajas, como la propagación clonal y la integración fisiológica. Además, inicialmente, las plántulas carecen de un rizoma desarrollado que les permita acumular sustancias de reserva con las que favorecer el crecimiento foliar ante los ataques por herbivoría. Así, creemos que la siembra en grupos, formando cepellones densos (alrededor de 3000 plántulas m⁻² en los experimentos 2 y 3), ha permitido a las plántulas adquirir una mayor resistencia a los herbívoros, tal y como se ha visto en la mayor supervivencia de estas plántulas al final del experimento y las tasas de crecimiento relativamente constantes, sin pérdida de biomasa foliar, en las plántulas del experimento 3 (Fig. I.22A-B). En este sentido, Kirkman (1998) también observó mejores resultados en los trasplantes cuando las plántulas de *Posidonia* eran sembradas en grupos, independientemente del método empleado.

La época del año también debe ser un factor a tener en cuenta, ya que podemos observar cómo el trasplante en los meses de abril-mayo es el más beneficioso para las plántulas (Fig. I.20) debido a que es la época de crecimiento natural en la pradera y les da un margen para crecer y adaptarse a las nuevas condiciones antes de que llegue la temporada más desfavorable del invierno donde, según Reyes *et al.* (1995), las praderas tienden a disminuir su crecimiento.

El periodo de aclimatación puede no ser un factor imprescindible, ya que las plántulas de *Cymodocea nodosa* sembradas directamente, sin periodo de aclimatación, están fisiológicamente preparadas para adaptarse a las nuevas características del medio natural y defenderse de los depredadores (Tabla I.12; Fig. I.22 y I.25). Estas plántulas han mostrado un crecimiento positivo prácticamente durante todo el estudio, **llegando en apenas tres meses de edad a formar rizomas plagiótropos**. Meehan & West (2004) estudiaron el crecimiento de las plántulas de *Posidonia oceanica* de la naturaleza, con edades comprendidas entre los 0.7 y 8.2 años, y de las 57 plántulas muestreadas sólo 6 habían desarrollado rizomas plagiótropos que, según los autores, no

se producen hasta los 4.3 ± 0.7 años. La producción de rizomas plagiótrpos, significa, según varios autores (Kirkman, 1998; Marbá *et al.*, 2004), el establecimiento del crecimiento vegetativo clonal necesario para la formación de nuevos parches y praderas. La proliferación vegetativa y el crecimiento clonal es el mecanismo principal que emplean estas especies para propagarse, particularmente durante la colonización de nuevos hábitats o de su recuperación tras perturbaciones (Marbá *et al.*, 2004). Sin embargo, la mayoría de las plántulas germinadas a partir de semillas en la naturaleza mueren antes de iniciar un crecimiento clonal (50-70% durante el primer año de vida), debido a que requieren de la acumulación de grandes cantidades de recursos y nutrientes (Marbá *et al.*, 2004). La formación de nuevos clones a partir de semillas se ha estimado en $0.009 \text{ clones m}^{-2} \text{ año}^{-1}$. La estructura clonal de la especie y la acumulación de recursos en los órganos subterráneos (carbón y nutrientes), permite a las especies el mantenimiento del crecimiento en las épocas más desfavorables y según Verges *et al.* (2008), la adquisición de la tolerancia y del crecimiento compensatorio frente a los herbívoros, como ya hemos mencionado. El hecho de que nuestras plántulas hayan generado un rizoma plagiótrpo en apenas tres meses de edad, una vez trasplantadas al medio natural, nos permite ser optimistas en este sentido.

Podemos concluir, de los distintos experimentos de trasplante, que las plántulas de *Cymodocea nodosa*, germinadas en condiciones *in vitro*, y trasplantadas a zonas de bajo hidrodinamismo en los meses de abril y mayo, sin ningún método de anclaje, con o sin periodo de aclimatación, pero sembradas en grupos formando un cepellón denso, pueden ser empleadas para restaurar o recuperar pequeñas zonas donde existían praderas previamente.

A la vista de los resultados positivos de germinación, aclimatación, y supervivencia en los trasplantes (además de la producción de rizomas plagiótrpos), nos preguntamos porqué no responden de la misma manera las semillas y plántulas germinadas en la naturaleza. Como respuesta podemos sugerir que existen varios motivos que explican estas diferencias. El primer motivo y más evidente puede ser que las plántulas vienen bien nutridas de los recipientes de cultivo *in vitro* enriquecidos con medio de cultivo PES o fortalecidas del periodo de aclimatación. Por otra parte, creemos que los bajos porcentajes de germinación obtenidos en la naturaleza pueden ser debidos al hecho de que las semillas no germinan inmediatamente al ser liberadas, como ya hemos mencionado anteriormente, y van enterrándose poco a poco en el sedimento con el paso del tiempo. Por consiguiente, y dado que el crecimiento del cotiledón tiene

un crecimiento máximo de unos 6 o 7 cm, las semillas que se encuentren a una profundidad mayor ven impedida su germinación. Además, si la semilla consigue germinar dentro de la pradera, la competencia por el espacio, los nutrientes o la luz, pueden ser factores que determinen la supervivencia. Sin embargo, las semillas que consiguen desplazarse y germinar fuera de la pradera se encuentran aisladas y desprotegidas frente a los ataques por herbivoría. Por lo tanto, las condiciones de siembra que proponemos, en zonas desnudas con bajo hidrodinamismo y sembradas todas las plántulas juntas formando un cepellón denso para protegerse de los herbívoros no pueden ser imitadas por la naturaleza.

En la Figura I. 26 se esquematiza la técnica de propagación desarrollada en este Capítulo: germinación de semillas *in vitro*, aclimatación en tanques y trasplante al mar de plántulas de *Cymodocea nodosa*. **El protocolo establecido permite proveer con gran cantidad de biomasa vegetal en forma de plántulas procedentes de semillas germinadas *in vitro* (que de otra forma se perderían en la naturaleza), diversas genéticamente y en cantidad suficiente para llevar a cabo la recuperación de pequeñas zonas o el reforzamiento de poblaciones existentes.**

I.6. CONCLUSIÓN CAPÍTULO I



- 1) Las secciones histológicas de las semillas sin germinar muestran embriones completamente desarrollados, carentes de tejido vascular y radícula, y formados por el cotiledón, el hipocotilo y el SAM (*Shoot Apical Meristem*).
 - El cotiledón es cilíndrico y estirado a lo largo del eje dorsal de la semilla, formado por una capa exterior de células epidérmicas y un conjunto de células compactas en el interior.
 - Dentro del cotiledón se integra el meristemo apical foliar o SAM, a partir del cual se desarrollarán posteriormente los haces y rizomas.
 - El hipocotilo es el tejido embrionario que ocupa la mayor parte de la semilla, formado por células cargadas de sustancias de reserva que van a ser empleadas como fuente de nutrientes durante la germinación y el desarrollo de la plántula.

- 2) La germinación de *Cymodocea nodosa* transcurre de acuerdo a la siguiente sucesión de eventos macroscópicos: Apertura de la cresta dorsal y emergencia del cotiledón. Crecimiento del cotiledón hasta que supera el sustrato y se vuelve verde. Desarrollo, alrededor del día 20-25, de las 2 primeras raíces que nacen de forma opuesta en la parte inferior del cotiledón y de la primera hoja en la parte superior del primer entrenudo con la consiguiente formación del primer haz. Emisión, a partir del día 30, de la segunda hoja y desarrollo de nuevas raíces seminales en la base del primer entrenudo.

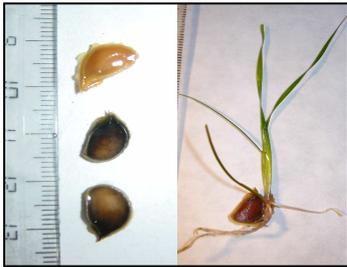
- 3) Descripción microscópica de la plántula recién germinada de *C. nodosa*:
 - El ápice del cotiledón es redondeado, con células alargadas y vacuolizadas. A lo largo del mismo se diferencia una epidermis, un parénquima celular y un sistema vascular central.
 - En la base del cotiledón se presenta un meristemo radicular desarrollado (RAM o *Root Apical Meristem*) con células provistas de sustancias de reserva, que se van alargando y compactando, dirigiéndose hacia lo que será el crecimiento radicular. Se observa también en este punto el comienzo del tejido vascular que conecta el meristemo radicular con el meristemo foliar.

- El meristemo foliar presenta células meristemáticas en la base cargadas de sustancias de reserva, varias yemas laterales y un primordio foliar desarrollado que emerge del cotiledón.
- 4) De los distintos tratamientos de shock hiposalino empleados para inducir la germinación de las semillas fueron los tratamientos de menor salinidad los que indujeron los más altos porcentajes de germinación. *In vitro*, la disminución de la salinidad natural del agua de mar, de 36.6 psu (-2.5 MPa) a 18 psu (-1.27 MPa), provoca la imbibición inmediata de las semillas por diferencia de potencial hídrico y la activación de los procesos germinativos. Hemos comprobado que la germinación también ocurre con salinidad de 36.6 psu, lo que supone que con una mínima entrada de agua en la semilla (de -3 ó -4 MPa a -2.5 MPa), se activan igualmente los procesos fisiológicos y metabólicos necesarios para iniciar la germinación.
 - 5) El tratamiento hiposalino condiciona el posterior desarrollo de las plántulas. Por lo tanto, considerando tanto el porcentaje de germinación como el posterior crecimiento hasta el estado 3 de desarrollo, el mejor tratamiento es el de hiposalinidad a 18 psu, en donde todas las semillas germinadas (57.7%) se desarrollan hasta plántula y pasan a la fase de aclimatación.
 - 6) De las diferentes experiencias de aclimatación observamos que las plántulas se aclimatan bien al pasarlas de los recipientes de cultivo *in vitro* a los acuarios o tanques, independientemente de la época del año. Nuestras condiciones de aclimatación estándar: tanques o acuarios con arena, flujo continuo de agua de mar, entre 30 y 200 $\mu\text{moles de fotones m}^{-2} \text{s}^{-1}$, y temperatura ambiente (entre 18 y 24°C) han resultado apropiadas para el crecimiento de las plántulas.
 - 7) En general, nuestras plántulas presentan un crecimiento positivo de todos los parámetros medidos a lo largo de 8 meses de estudio, con tendencia a continuar su desarrollo de forma positiva ya que las plántulas están sanas antes de llevarlas al mar. Las plántulas pueden mantenerse durante largos periodos en los tanques (hasta 6-8 meses) controlando siempre el potencial redox del sustrato.

- 8) Del estudio de crecimiento realizado durante la aclimatación de 45 días observamos que la tasa de crecimiento en el tiempo no es lineal, lo que nos permite establecer el momento óptimo de trasplante a partir del día 30 de aclimatación.
- 9) De las distintas experiencias de trasplante llevadas a cabo con plántulas de *Cymodocea nodosa* germinadas *in vitro*, valoramos los principales factores que pueden afectar la supervivencia de las plántulas:
- La fijación al sustrato no es un factor determinante en zonas de bajo hidrodinamismo, ya que las plántulas sembradas sin ningún tipo de anclaje permanecieron adheridas durante todo el experimento. Sin embargo, puede resultar dañino para las plántulas atarlas con hilo de bala o cuerdas a las mallas para evitar su desprendimiento.
 - El herbivorismo ha sido un factor determinante en la mayoría de los experimentos, ya que debilita mucho a las plántulas que no consiguen sobrevivir por largos periodos.
 - El trasplante en los meses de abril-mayo ha resultado ser más favorable para la supervivencia, debido a que es la época de crecimiento natural de la pradera.
 - El periodo de aclimatación no es un factor imprescindible, ya que las plántulas sembradas en grupos y sin periodo de aclimatación, están fisiológicamente preparadas para adaptarse a las nuevas características del medio natural y defenderse de los depredadores.
 - La densidad es un factor importante, ya que la siembra en grupos, formando cepellones densos (alrededor de 3000 plántulas m⁻²), permite a las plántulas adquirir una mayor resistencia a los herbívoros y desarrollar rizomas plagiótropos, resultando en altas tasas de supervivencia al finalizar el experimento. La formación de rizomas plagiótropos es un factor clave, ya que les va a permitir acumular recursos para mantener el crecimiento en las épocas más desfavorables, y la adquisición de la tolerancia y del crecimiento compensatorio frente a los herbívoros.

- 10) Concluimos finalmente que las plántulas de *Cymodocea nodosa*, germinadas en condiciones *in vitro*, y trasplantadas a zonas de bajo hidrodinamismo en los meses de abril-mayo, sin ningún método de anclaje, con o sin periodo de aclimatación, pero sembradas en grupos formando un cepellón denso, pueden ser empleadas para restaurar y recuperar pequeñas zonas o reforzar poblaciones existentes.

I.7. BIBLIOGRAFÍA CAPÍTULO I



Ackerman, J.D., 2006. Seagrass reproduction of seagrasses: pollination in the marine context. In: Seagrasses: Biology, Ecology and Their Conservation. Larkum, A.W.D., Orth, J.J., Duarte, C.M., (Eds). Springer. pp. 89-109.

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 “sebadales” en el Archipiélago Canario. Vieraea 8, 365-376.

Afonso-Carrillo, J., Sansón, M., 1999. Algas, hongos y fanerógamas marinas de las Islas Canarias. Clave analítica. Servicio de Publicaciones Universidad de La Laguna. pp. 256.

Ailstock, M.S., Fleming, W.J, Cooke, T.J. 1991. The characterization of axenic culture systems suitable for plant propagation and experimental studies of the submersed aquatic angiosperm *Potamogeton pectinatus* (Sago Pondweed). Estuaries 14(1), 57-64.

Ailstock, S., Shafer, D., 2006. Protocol for large-scale collection, processing, and storage of seeds of two mesohaline submerged aquatic plant species. SAV Technical Notes Collection (ERDC/TN SAV-06-3). Vicksburg, MS: U.S. Army Engineer Research & Development Center.

Alexandre, A., Cabaço, S., Santos, R., Serrão, E.A., 2006. Timing and success of reproductive stages in the seagrass *Zostera noltii*. Aquatic Botany 85, 219–223.

Balestri, E., Cinelli, F., 1995. Culture of seedlings of *Posidonia oceanica* under laboratory conditions. La Posidonia Oceanica. Suplemento alla R.M. pp. 62-65.

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. Journal of Experimental Marine Biology and Ecology 228, 209-225.

Balestri, E., Bertini, S., 2003. Growth and development of *Posidonia oceanica* seedling treated with plant growth regulators: possible implications for meadow restoration. Aquatic Botany 76, 291-297.

Barberá, C., Tuya, F., Boyra, A., Sanchez-Jerez, P., Blanch, I., Haroun, R.J., 2005. Spatial variation in the structural parameters of *Cymodocea nodosa* seagrass meadows in the Canary Islands: a multiscaled approach. Botanica Marina 48, 122-126.

Barceló Coll, J., Nicolás Rodrigo, G., Sabater García, B., Sánchez-Tamés, R., 2001. Fisiología Vegetal. Ed. Pirámide, Madrid.

Belzunce, M., Navarro, R.M., Rappoport, H., 2005. Seed and early plantlet structure of the Mediterranean seagrass *Posidonia oceanica*. *Aquatic Botany* 82, 269-283.

Belzunce, M., Navarro, R.M., Rappoport, H., 2008. *Posidonia oceanica* seedling root structure and development. *Aquatic Botany* 88, 203-210.

Birch, W.R., 1981. Morphology of germinating seeds of the seagrass *Halophila spinulosa* (R.Br.) Aschers (Hydrocharitaceae). *Aquatic Botany* 11, 79-90.

Bird, K.T., Cody B.R., Jewett-Smith, J., Kane M.E., 1993. Salinity effects on *Ruppia maritima* L. cultured in vitro. *Botanica Marina* 36, 23-28.

Bird, K.T., Jewett-Smith, J., 1994. Development of a medium and culture system for in vitro propagation of the seagrass *Halophila engelmannii*. *Canadian Journal of Botany* 72, 1503-1510.

Bird, K.T., Jewett-Smith, J., Fonseca, M.S., 1994. Use of in vitro– propagated *Ruppia maritima* for sea meadow restoration. *Journal of Coastal Research* 10, 732-737.

Bird, K.T., Brown, M.S., Henderson, T.T., O'Hara, C.E., Robbie, J.M., 1996. Culture studies of *Ruppia maritima* L. in bicarbonate and sucrose based media. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 199, 153-164.

Bornet, E., 1864. Recherches sur le Phucagrostis major Cavol. *Annales des Sciences Naturelles* 5, Série Botanique 1, 5-51.

Bragg, L.H., McMillan, C., 1986. SEM comparison of fruits of a seagrass, *Halodule* (Cymodoceae), from Australia and Texas. *American Journal of Botany* 73(6), 815-821.

Brenchley, J.L., Probert, R.J., 1998. Seed germination responses to some environmental factors in the seagrass *Zostera capricorni* from eastern Australia. *Aquatic Botany* 62, 177-188.

Buia, M.C., Mazzella, L., 1991. Reproductive phenology of the Mediterranean seagrasses *Posidonia oceanica* (L.) Delile, *Cymodocea nodosa* (Ucria) Aschers., and *Zostera noltii* Hornem. *Aquatic Botany* 40, 343-362.

Caye, G., Meinesz, A., 1985. Observations on the vegetative development, flowering and seeding of *Cymodocea nodosa* (Ucria) Ascherson on the Mediterranean coasts of France. *Aquatic Botany* 22, 277-289.

Caye, G., Meinesz, A., 1986. Experimental study of seed germination in the seagrass *Cymodocea nodosa*. *Aquatic Botany* 26, 79-87.

Caye, G., Bulard, C., Meinesz, A., Loques, F., 1992. Dominant role of seawater osmotic pressure on germination in *Cymodocea nodosa*. *Aquatic Botany* 42, 187-193.

Cebrián, J., Duarte, C.M., 1998. Patterns in leaf herbivory on seagrasses. *Aquatic Botany* 60, 67-82.

Churchill, A.C., 1983. Field studies on seed germination and seedling development in *Zostera marina* L. *Aquatic Botany* 9, 201-220.

Churchill, A.C., 1992. Growth characteristics of *Zostera marina* seedlings under anaerobic conditions. *Aquatic Botany* 43, 379-392.

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. *Aquatic Botany* 49, 47-58.

Cooper, G., 1982. Reimplantation de *Posidonia oceanica* protection des implants. *Bulletin Ecology* 13(1), 65-73.

Cunha, A., Araújo, A., 2009. New distribution limits of seagrass beds in West Africa. *Journal of Biogeography* 36 (8), 1621-1622.

Duarte, C.M., Sand-Jensen, K., 1990. Seagrass colonization: patch formation and patch growth in *Cymodocea nodosa*. *Marine Ecology Progress Series* 65, 193-200.

García-Jiménez, P., Rodrigo, M., Robaina, R.R., 1998. Influence of plant growth regulators, polyamines and glycerol interaction on growth and morphogenesis of carposporelings of *Grateloupia* cultured *in vitro*. *Journal of Applied Phycology* 10, 95-100.

García-Jiménez, P., Navarro, P.E., Santana, C.H., Luque, A., Robaina, R.R., 2006. Anatomical and nutritional requirements for induction and sustained growth in vitro of *Cymodocea nodosa* (Ucria) Ascherson. *Aquatic Botany* 84, 79-84.

González, N., 1986. Flórmula y vegetación bentónica de la playa de Las Canteras. Tesis Doctoral. Departamento Biología Universidad de La Laguna (unpubl.) pp. 267.

González-Jiménez, J.F., Hernández, C., Marrero, P., Rapp, E., 1997. Peces de Canarias: Guía Submarina. Lemus, F., (Ed). Spain. pp. 223.

Granger, S., Traber M., Nixon, S.W., Keyes, R., 2002. A practical guide for the use of seeds in eelgrass (*Zostera marina* L.) restoration. I. Collection, processing, and storage. Schwartz, M., (Ed). Rhode Island Sea Grant, Narragansett, RI. pp. 20.

Greve, T.M., Binzer, T., 2004. Which factors regulate seagrass growth and distribution? In: European seagrasses: an introduction to monitoring and management. Borum, J., Duarte, C.M., Krause-Jensen, D., Greve, T.M., (Eds). Publisher: The M&MS project. pp. 19-23.

Greve, T.M., Krause-Jensen, D., Rasmussen, M.B., Christensen, P.B., 2005. Means of rapid eelgrass (*Zostera marina* L.) recolonisation in former dieback areas. *Aquatic Botany* 82, 143-156.

Harrison, P.G., 1991. Mechanisms of seed dormancy in an annual population of *Zostera marina* (eelgrass) from The Netherlands. *Canadian Journal of Botany* 69, 1972-1976.

Harwell, M.C., Orth, R.J., 1999. Eelgrass (*Zostera marina* L.) seed protection for field experiments and implication for large scale restoration. *Aquatic Botany* 64, 51-61.

Heck, K.L., Jr., Valentine, J.F., 2006. Plant-herbivore interactions in seagrass meadows. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 330(1), 420-436.

Hootsmans, M.J.M., Vermaat, J.E., van Vierssen, W., 1987. Seed bank development, germination and early seedling survival of two seagrass species from the Netherlands: *Zostera marina* L. and *Zostera noltii* Hornem. *Aquatic Botany* 28, 275-285.

Hughes, R.G., Lloyd, D., Ball, L., Emson, D., 2000. The effects of the polychaete *Nereis diversicolor* on the distribution and transplanting success of *Zostera noltii*. *Helgoland Marine Research*, 54 (2-3), 129-136.

Inglis, G.J., 2000. Variation in the recruitment behaviour of seagrass seeds: implications for population dynamics and resource management. *Pacific Conservation Biology* 5, 51-259.

Jewett-Smith, J., McMillan, C., 1990. Germination and seedling development of *Halophila engelmannii* Aschers. (Hydrocharitaceae) under axenic conditions. *Aquatic Botany* 36, 167-177.

Kawasaki, Y., 1993. Effects of some environmental factors on seed germination and seedling growth of *Zostera marina* L. In: International Workshop on Seagrass Biology, Itoimato. Proceedings. Ocean Research Institute, University of Tokyo. pp 28-35.

Kenworthy, W.J., 2000. The role of sexual reproduction in maintaining populations of *Halophila decipiens*: implications for the biodiversity and conservation of tropical seagrass ecosystems. *Pacific Conservation Biology* 5, 251-259.

Kirkman, H., 1998. Pilot experiments on planting seedlings and small seagrass propagules in Western Australia. *Marine Pollution Bulletin* 37, 460-467.

Koch, E. W., Durako, M. J., 1991. In vitro studies of the submerged angiosperm *Ruppia maritima*: Auxin and cytokinin effects on plant growth and development. *Marine Biology* 110(1), 1-6.

Kuo, J., Kirkman, H., 1987. Floral and seedling morphology and anatomy of *Thalassodendron pachyrhizum* den Hartog (*Cymodoceaceae*). *Aquatic Botany* 29, 1-17.

Kuo, J., Kirkman, H., 1990. Anatomy of viviparous seagrasses seedlings of *Amphibolis* and *Thalassodendron* and their nutrient supply. *Botanica Marina* 33, 117-126.

Kuo, J., Iizumi, H., Nilsen, B.E., Aioi, K., 1990. Fruit anatomy, seed germination and seedling development in the Japanese seagrass *Phyllospadix* (*Zosteraceae*). *Aquatic Botany* 37, 229-245.

Kuo, J., Coles, R.G., Lee Long, W.J., Mellors, J.E., 1991. Fruits and seeds of *Thalassia hemprichii* (Hydrocharitaceae) from Queensland, Australia. *Aquatic Botany* 40, 165-173.

Kuo, J., Kirkman, H., 1992. Fruits, seeds and germination in the seagrass *Halophila ovalis* (Hydrocharitaceae). *Botanica Marina* 35, 197-204.

Kuo, J., Kirkman, H., 1996. Seedling development of selected *Posidonia* species from southwest Australia. In: Seagrass biology: Proceedings of an International Workshop. Kuo, J.,

Phillips, R.C., Walker, D.I., Kirkman H., (Eds). Rottneest Island Western Australia. Faculty of Science, University of Western Australia, Perth. pp. 57-64.

Kuo, J., den Hartog, C., 2006. Seagrass morphology, anatomy, and ultrastructure. In: Seagrasses: Biology, Ecology and Conservation. Larkum, A.W.D., Orth, R.J., Duarte, C.M., (Eds). Netherlands, Springer Verlag. pp. 51-87.

Loques, F., Caye, G., Meinesz, A., 1990. Germination in the marine phanerogam *Zostera noltii* Hornemann at Golfe Juan (French Mediterranean). Aquatic Botany 38, 249-260.

Marbà, N., Duarte, C.M., Alexandra, A., Cabaço, S., 2004. How do seagrasses grow and spread?. In: European seagrasses: an introduction to monitoring and management. Borum, J., Duarte, C.M., Krause-Jensen, D., Greve, T.M., (Eds). Publisher: The M&MS project. pp. 11-19.

McMillan, C., 1981. Seed reserves and seed germination for two seagrasses, *Halodule wrightii* and *Syringodium filiforme*, from the Western Atlantic. Aquatic Botany 11, 279-296.

McMillan, C., Bridges, K.W., Kock, R.L., Falanruw, M., 1982. Fruit and seedlings of *Cymodocea rotundata* in Yap, Micronesia. Aquatic Botany 14, 99-105.

McMillan, C., 1983. Seed germination for an annual form of *Zostera marina* from the Sea of Cortez, Mexico. Aquatic Botany 16, 105-110.

McMillan, C., 1987. Seed germination and seedling morphology of the seagrass, *Halophila engelmannii* (Hydrocharitaceae). Aquatic Botany 28, 179-188.

McMillan, C., 1988. Seed germination and seedling development of *Halophila decipiens* Ostenfeld (Hydrocharitaceae) from Panama. Aquatic Botany 31, 169-176.

Meehan, A.J., West, R.J., 2004. Seedling development and patch formation of the seagrass *Posidonia australis* in a southeast Australian estuary. Aquatic Botany 79, 1-14.

Meinesz, A., Caye, G., Loques, F., Molenaar, H., 1993. Polymorphism and development of *Posidonia oceanica* transplanted from different parts of the Mediterranean into the National Park of Port-Cros. Botanica Marina 36, 209-216.

Mena, J., Falcón, J.M., Brito, A., Rodríguez, F.M., Mata, M., 1993. Catálogo preliminar de la ictiofauna de las praderas de fanerógamas marinas de la isla de Tenerife, Islas Canarias. Publicación Especial Instituto Español Oceanografía, 217-222.

Moore, K.A., Orth, R.J., Nowak, J.F., 1993. Environmental regulation of seed germination in *Zostera marina* L. (eelgrass) in Chesapeake Bay: effects of light, oxygen and sediment burial. *Aquatic Botany* 45, 79-91.

Obroucheva, N.V., Antipova, O.V., 2004. The role of water uptake in the transition of recalcitrant seeds from dormancy to germination. *Russian Journal of Plant Physiology* 51(6), 848-856.

Olesen, B., Marbà, N., Duarte, C.M., Savelle, R.S., Fortes, M.D., 2004. Recolonization dynamics in a mixed seagrass meadow: The role of clonal versus sexual processes. *Estuaries* 27(5), 770-780.

Orth, R.J., Moore, K.A., 1983. Seed germination and seedling growth of *Zostera marina* L. (eelgrass) in the Chesapeake Bay. *Aquatic Botany* 15(2), 117-131.

Orth, R.J., Luckenbach, M., Moore, K.A., 1994. Seed dispersal in a marine macrophyte: implications for colonization and restoration. *Ecology* 75, 1927-1939.

Orth, R.J., Harwell, M.C., Bailey, E.M., Bartholomew, A., Jawad, J.T., Lombana, A.V., Moore, K.A., Rhode, J.M., Woods, H.E., 2000. A review of issues in seagrass seed dormancy and germination: implications for conservation and restoration. *Marine Ecology Progress Series* 200 277-288.

Orth, R.J., Harwell, M.C., Inglis, G.J., 2006. Ecology of seagrass seeds and seagrass dispersal processes. In: *Seagrasses: Biology, Ecology and Conservation*. Larkum, A.W.D., Orth, R.J., Duarte, C.M., (Eds). Springer Netherlands. pp. 111-133.

Orth, R.J., Marion, S.R., Granger, S., Traber, M., 2009. Evaluation of a mechanical seed planter for transplanting *Zostera marina* (eelgrass) seeds. *Aquatic Botany* 90(2), 204-208.

Pammenter, N.W., Berjak, P., 2000. Aspects of recalcitrant seed physiology. *Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal* 12, 56-69.

Pavón-Salas, N., Herrera, R., Hernández-Guerra, A., Haroun, R., 2000. Distribution pattern of seagrasses in the Canary Islands (Central-East Atlantic Ocean). *Journal of Coastal Research* 16, 329-335.

- Piazzì, L., Balestri, E., Magri, M., Cinelli, F., 1998. Experimental transplanting of *Posidonia oceanica* (L.) Delile into a disturbed habitat in the Mediterranean Sea. *Botanica Marina* 41, 593-601.
- Piazzì, L., Acunto, S., Cinelli, F., 1999. In situ survival and development of *Posidonia oceanica* (L.) Delile seedlings. *Aquatic Botany* 63, 103-112.
- Pickerell, C.H., Schott, S., Wyllie-Echeverria, S., 2005. Buoy deployed seeding: Demonstration of a new eelgrass (*Zostera marina* L.) planting method. *Ecological Engineering* 25, 127-136.
- Pirc, H., Buia, M.C., Mazzella, L., 1986. Germination and seedling development of *Cymodocea nodosa* (Ucria) Aschers. under laboratory conditions. *Aquatic Botany* 26(1-2), 181-188.
- Plus, M., Deslous-Paoli, J.M., Dagault, F., 2003. Seagrass (*Zostera marina* L.) bed recolonization after anoxia-induced full mortality. *Aquatic Botany* 77, 121-134.
- Pospisilova, J., Wilhelmova, N., Synkova, H., Catsky, J., Krebs, D., Ticha, I., Hanackova, B., Snopek, J., 1998. Acclimation of tobacco plantlets to ex vitro conditions as affected by application of abscisic acid. *Journal of Experimental Botany* 49, 863-869.
- Prado, P., Tomas, F., Alcoverro, T., Romero, J., 2007. Extensive direct measurements of *Posidonia oceanica* defoliation confirm the importance of herbivory in temperate seagrass meadows. *Marine Ecology Progress Series* 340, 63-71.
- Procaccini, G., Piazzì, L., 2001. Genetic polymorphism and transplantation success in the Mediterranean seagrass *Posidonia oceanica*. *Restoration Ecology* 9(3), 332-338.
- Provasoli, L., 1968. Media and prospects for cultivation of marine algae. In: *Cultures and Collections of Algae*. Watanabe, A., Hattori, A., (Eds). Japanese Society of Plant Physiology, Tokyo. pp. 47-74.
- Reusch, T.B.H., 2002. Microsatellites reveal high population connectivity in eelgrass (*Zostera marina*) in two contrasting coastal areas. *Limnology and Oceanography* 47(1), 78-85.
- Reyes, J., Sansón, M., 1994. Morfología y anatomía de *Cymodocea nodosa* (Cymodoceae, Magnoliophyta) en praderas de El Médano (S Tenerife, islas Canarias). *Vieraea* 23, 43-64.

Reyes, J., Sansón, M., Afonso-Carrillo, J., 1995. Distribution and reproductive phenology of the seagrass *Cymodocea nodosa* (Ucria) Ascherson in the Canary Islands. *Aquatic Botany* 50(2), 171-180.

Seddon, S., 2004. Going with the flow: Facilitating seagrass rehabilitation. *Ecological Management and Restoration* 5(3), 167-176.

Seddon, S., Venema, S., Millar, D., 2004. Seagrass rehabilitation in Metropolitan Adelaida. II. Donor bed independent methods progress report. Progress report to the coast protection branch. Department for Environment and Heritage. SARDI Aquatic Sciences, Adelaide.

Taylor, A.R.A., 1957a. Studies of the development of *Zostera marina* L. I. The embryo and seed. *Canadian Journal of Botany* 35, 477-499.

Taylor, A.R.A., 1957b. Studies of the development of *Zostera marina* L. II. Germination and seedling development. *Canadian Journal of Botany* 35, 681-695.

Terrados, J., 1993. Sexual reproduction and seed banks of *Cymodocea nodosa* (Ucria) Ascherson meadows on the southeast Mediterranean coast of Spain. *Aquatic Botany* 46, 293-299.

Thorhaug, A., 1974. Transplantation of the seagrass *Thalassia testudinum* König. *Aquaculture* 4, 177-183.

Thorhaug, A., 1985. Large-scale seagrass restoration in a damaged estuary. *Marine Pollution Bulletin* 16, 55-62.

Tillich, H.J., 2007. Seedling diversity and the homologies of seedling organs in the order Poales (Monocotyledons). *Annals of Botany* 100, 1413-1429.

Tomas, F., Turon, X., Romero, J., 2005. Effects of herbivores on a *Posidonia oceanica* seagrass meadow: importance of epiphytes. *Marine Ecology Progress Series* 287, 115-125.

Tsekos, I., 1983. The ultrastructure of carposporegenesis in *Gigartina teedii* (Roth) Lamour. (Gigartinales, Rhodophyceae): Gonimoblast cells and carpospores. *Flora* 174, 191-211.

Valentine, J.R., Heck, Jr.K.L., 1999. Seagrass herbivory: evidence for the continual grazing of marine grasses. *Marine Ecology Progress Series* 176, 291-302.

Vergés, A., Becerro, M.A., Alcoverro, T., Romero, J., 2007. Experimental evidence of chemical deterrence against multiple herbivores in the seagrass *Posidonia oceanica*. Marine Ecology Progress Series 343, 107-114.

Vergés, A., Pérez, M., Alcoverro, T., Romero, J., 2008. Compensation and resistance to herbivory in seagrasses: induced responses to simulated fish consumption. Oecologia 155(4), 751-760.

Vertucci, C.W., Farrant, J.M., 1995. Acquisition and loss of desiccation tolerance. In: Seed development and germination. Kigel, J., Galili, G., (Eds). New York: Marcel Dekker. pp. 237-271.

Watson, L., Dallwitz, M.J., 1992. The families of flowering plants: descriptions, illustrations, identification, and information retrieval. Version: 10th April 2008. <http://delta-intkey.com>.

Waycott, M., 1995. Assessment of genetic variation and clonality in the seagrass *Posidonia australis* using RAPD and allozyme analysis. Marine Ecology Progress Series 116, 289-295.

Wear, R.J., Tanner, J.T., Venema, S., 2006. Seagrass rehabilitation in metropolitan Adelaide III: Development of recruitment facilitation methodologies. Prepared for the Coastal Protection Branch, Department for Environment and Heritage. SARDI Aquatic Sciences Publication No.04/0038-3. SARDI, Aquatic Sciences, Adelaide.

Weast, R.C., Astle, M.J., 1981. CRC Handbook of chemistry and physics: A ready reference book of chemical and physical data. Boca Raton, Florida : CRC Press.

Whitfield, P.E., Kenworthy, W.J., Durako, M.J., Hammerstrom, K.K., Merello, M.F., 2004. Recruitment of *Thalassia testudinum* seedlings into physically disturbed seagrass beds. Marine Ecology Progress Series 267, 121-131.

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.

Woodhead, J.L., Bird, K.T., 1998. Efficient rooting and acclimation of micropropagated *Ruppia maritima* Loisel. Journal of Marine Biotechnology 6(3), 152-156.

Zakaria, M.H., Sidik, B.J., Hishamuddin, O., 1999. Flowering, fruiting and seedling of *Halophila beccarii* Aschers. (Hydrocharitaceae) from Malaysia. Aquatic Botany 65, 199-207.

I.8. ANEXO CAPÍTULO I



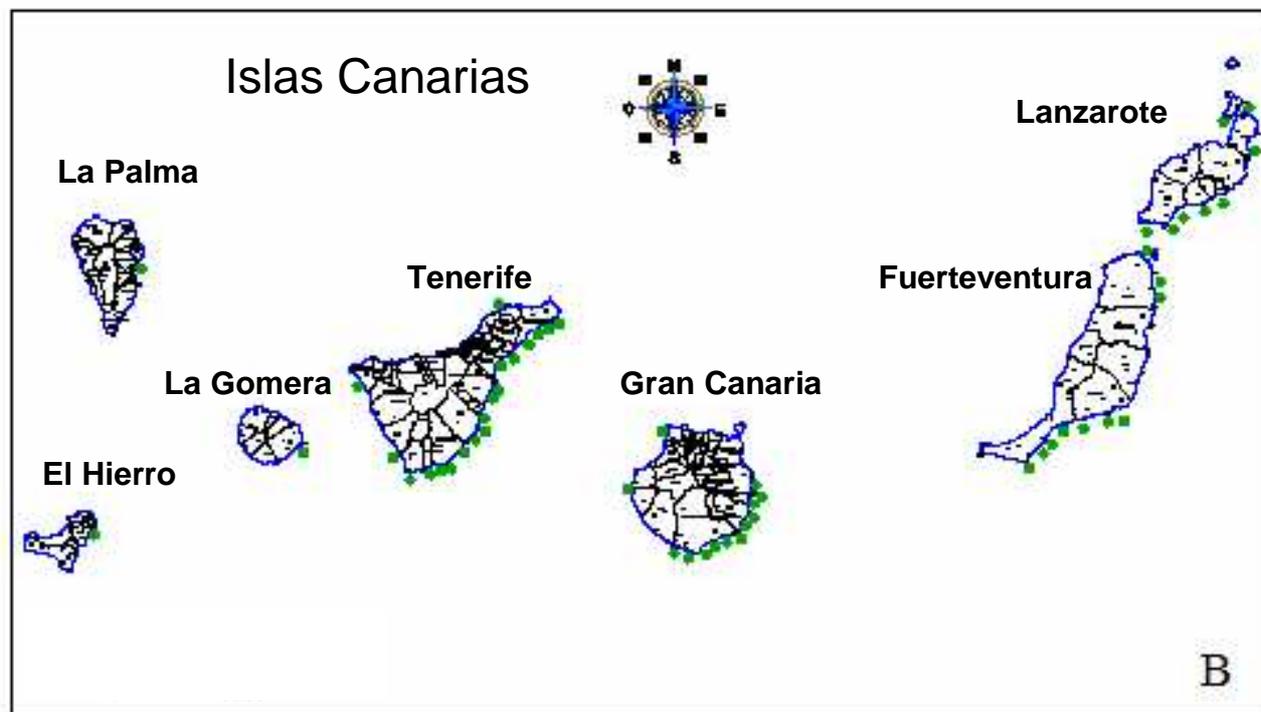


Fig. I.1. **A.** Mapa de distribución mundial de *Cymodocea nodosa* (basado en Afonso-Carrillo & Gil-Rodríguez, 1980; Reyes *et al.*, 1995; Afonso Carrillo & Sansón, 1999; Pavon-Salas *et al.*, 2000). **B.** Mapa de distribución de *C. nodosa* en Canarias (basado en Reyes *et al.*, 1995; Pavon-Salas *et al.*, 2000; Barbera *et al.*, 2005). Realizados con Google Earth 5.0 (beta) y Autodesk Map™ Series 2004.

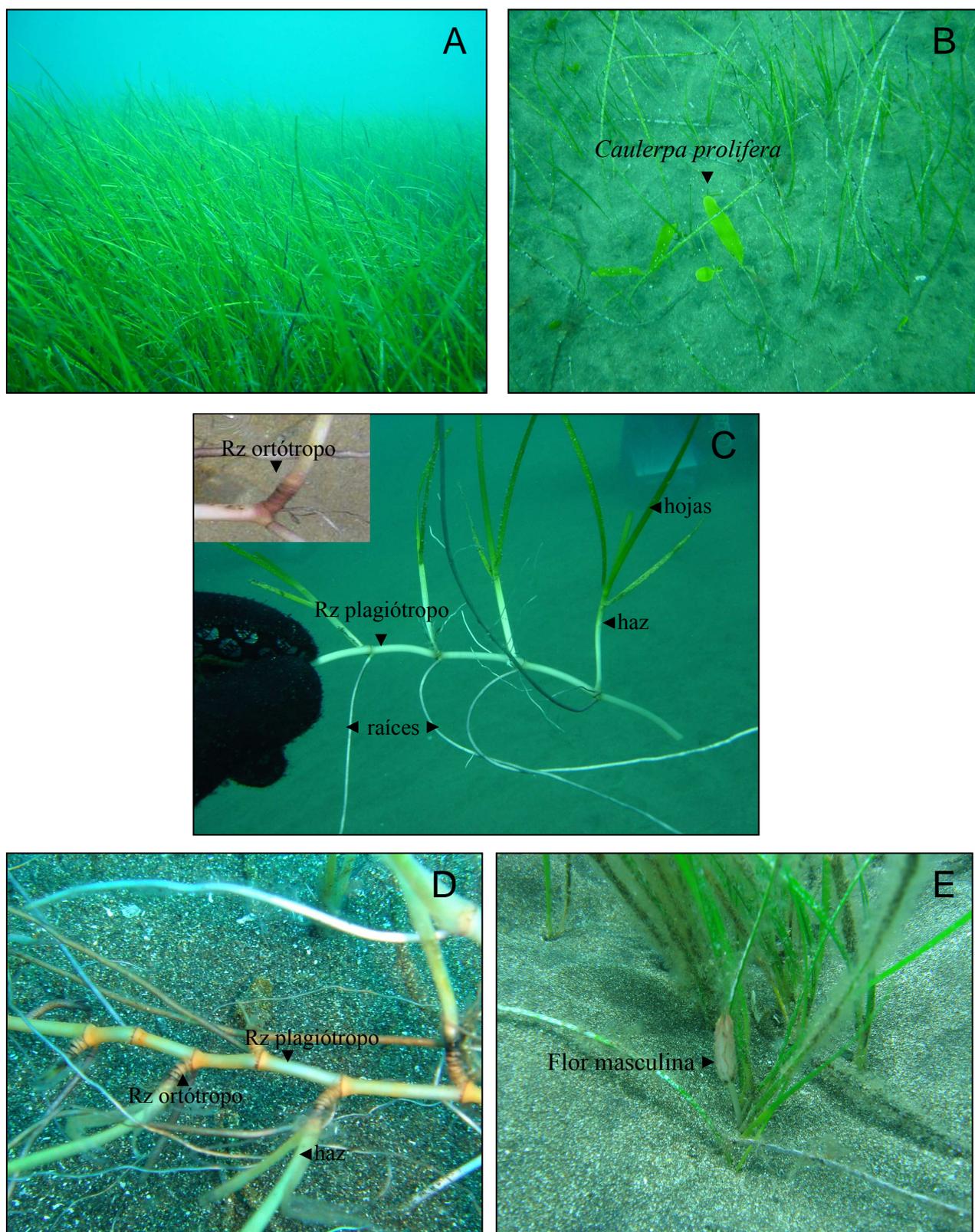


Fig. 1.2. **A.** Pradera monoespecífica densa de *Cymodocea nodosa*. **B.** Pradera mixta de *C. nodosa* y *Caulerpa prolifera*. **C-D.** Esquema general de *C. nodosa*: rizoma plagiótropo del que parten raíces y rizomas ortótropos en cada nudo. Los haces, formados por varias hojas, nacen de los rizomas ortótropos. Foto inserta: detalle de rizoma ortótropo. **E.** Flor masculina de *C. nodosa*.

Maite Zarranz Elso

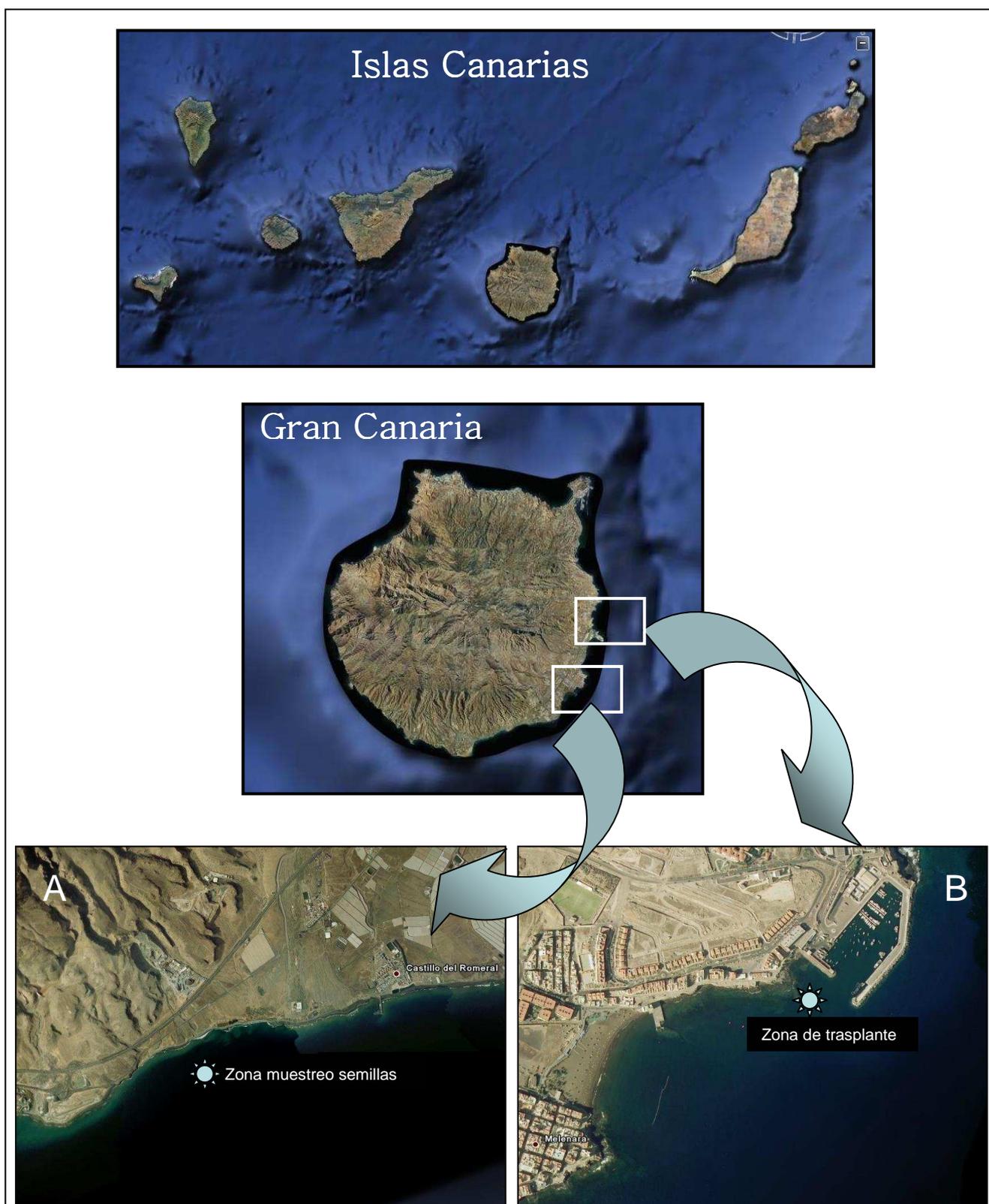


Fig. I.3. A. Mapa de localización de la zona de muestreo de semillas de *Cymodocea nodosa*. B. Zona de trasplante de plántulas de *C. nodosa* en la isla de Gran Canaria. Realizado con Google Earth 5.0 (beta).



Fig. I.4. Recipiente tipo Magenta^R -G7 (Sigma Co.USA), con arena y agua de mar enriquecida, empleado para la siembra de las semillas.

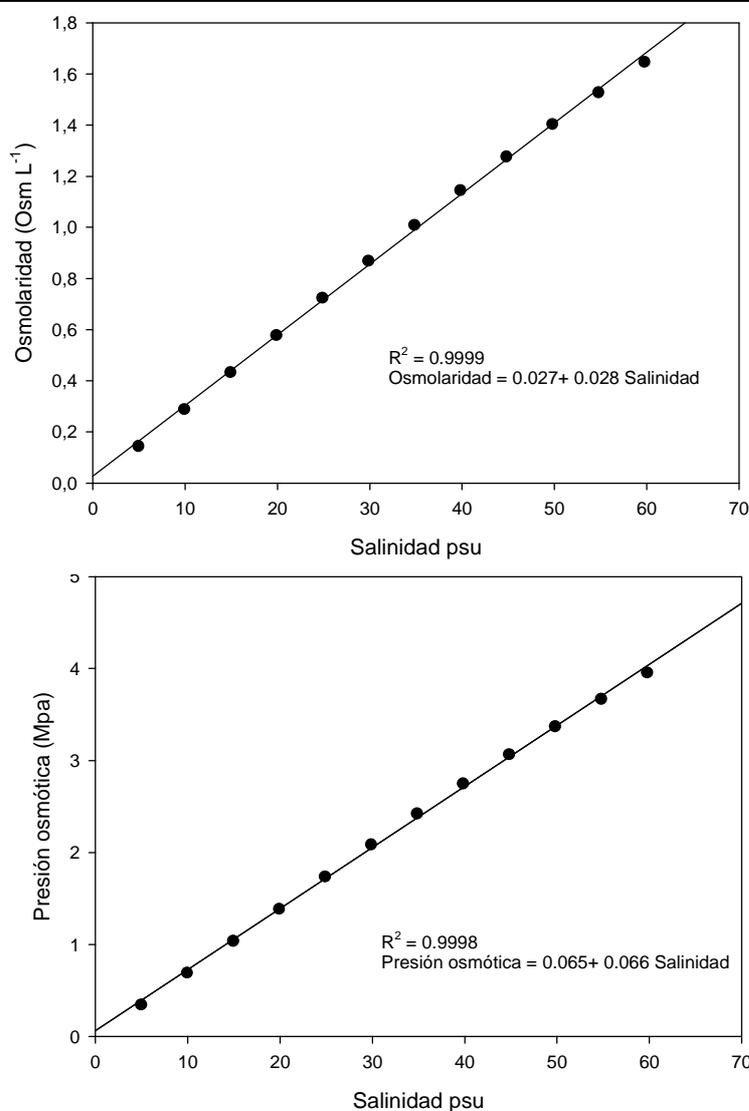


Fig. I.5. Relación entre salinidad y osmolaridad (Osm L⁻¹) y presión osmótica (MPa) del medio (basado en los datos para propiedades del agua de mar del *Handbook of chemistry and Physics*, Weast & Astle, 1981). Realizado con SPSS®13.0 for Windows® (SPSS Inc. Chicago, Illinois, USA) y Sigmaplot 8.02.

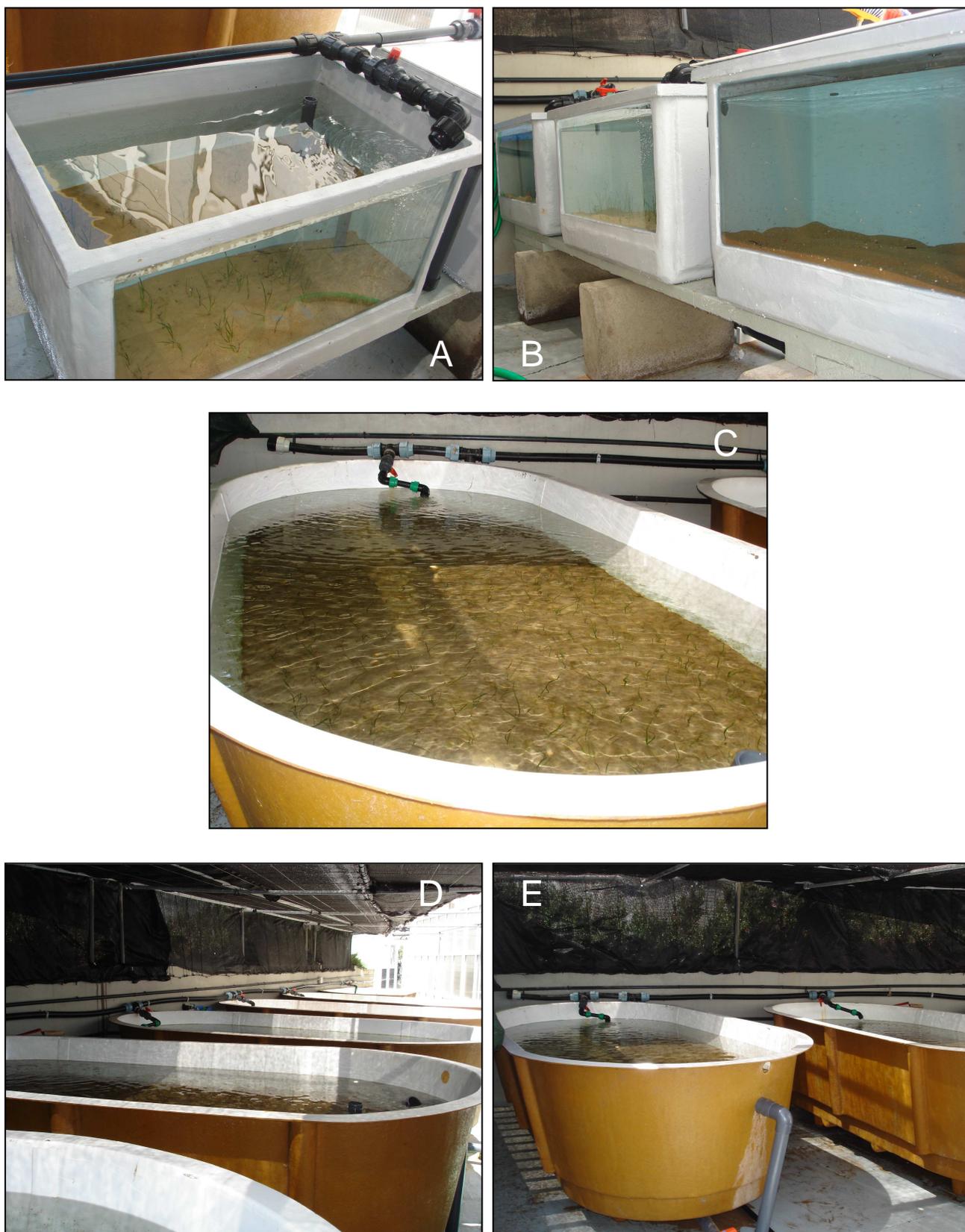


Fig. I.6. Experiencias de aclimatación de plántulas germinadas *in vitro*. A-B. Acuarios. C-E. Tanques de cultivo situados en las instalaciones del Instituto Canario de Ciencias Marinas.

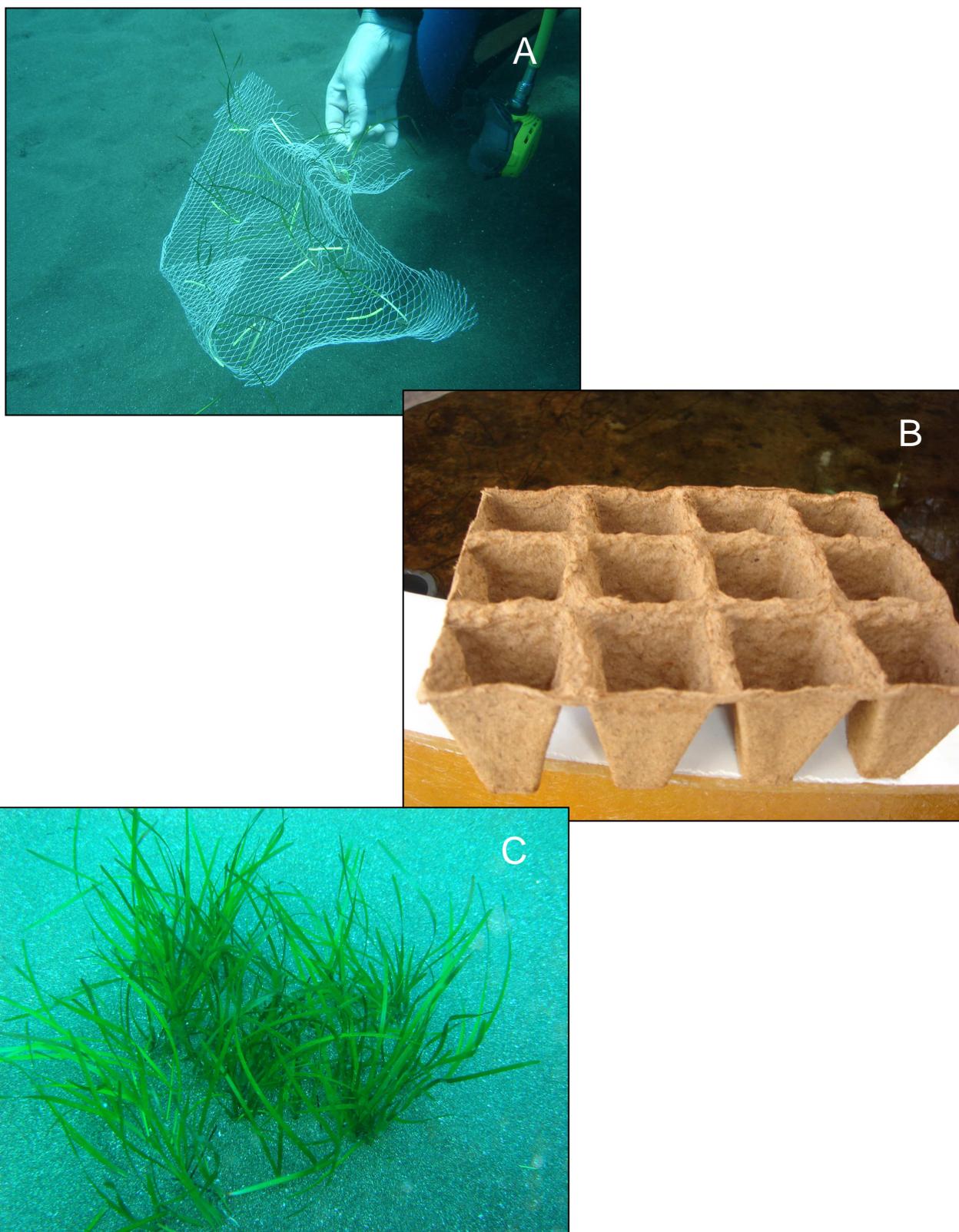


Fig. I.7. Métodos empleados en los distintos experimentos de trasplante. **A.** Exp.1. Plántulas unidas a una malla de 20 x 20 cm. **B.** Exp.2. Recipiente biodegradable. **C.** Exp.3. Plántulas sin periodo de aclimatación y plantadas libres formando un cepellón.

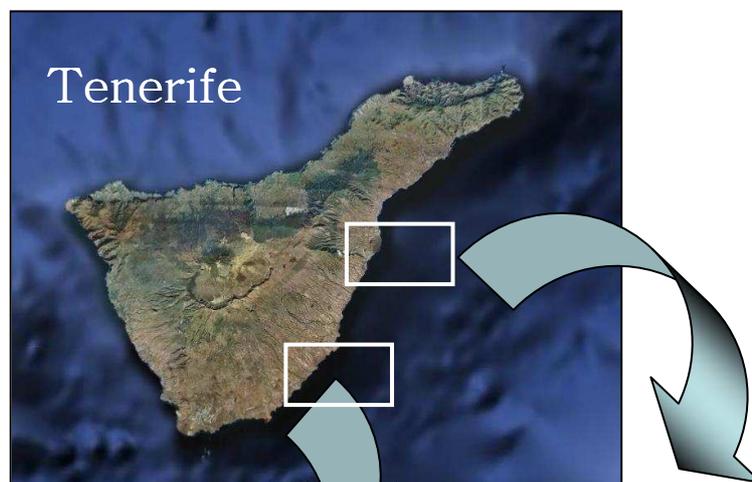


Fig. I.8. Implementación del protocolo de restauración en una pradera ubicada en la isla de Tenerife. **A.** Localización de la zona de muestreo de semillas de *Cymodocea nodosa*. **B.** Zona de trasplante de plántulas. Realizado con Google Earth 5.0 (beta).

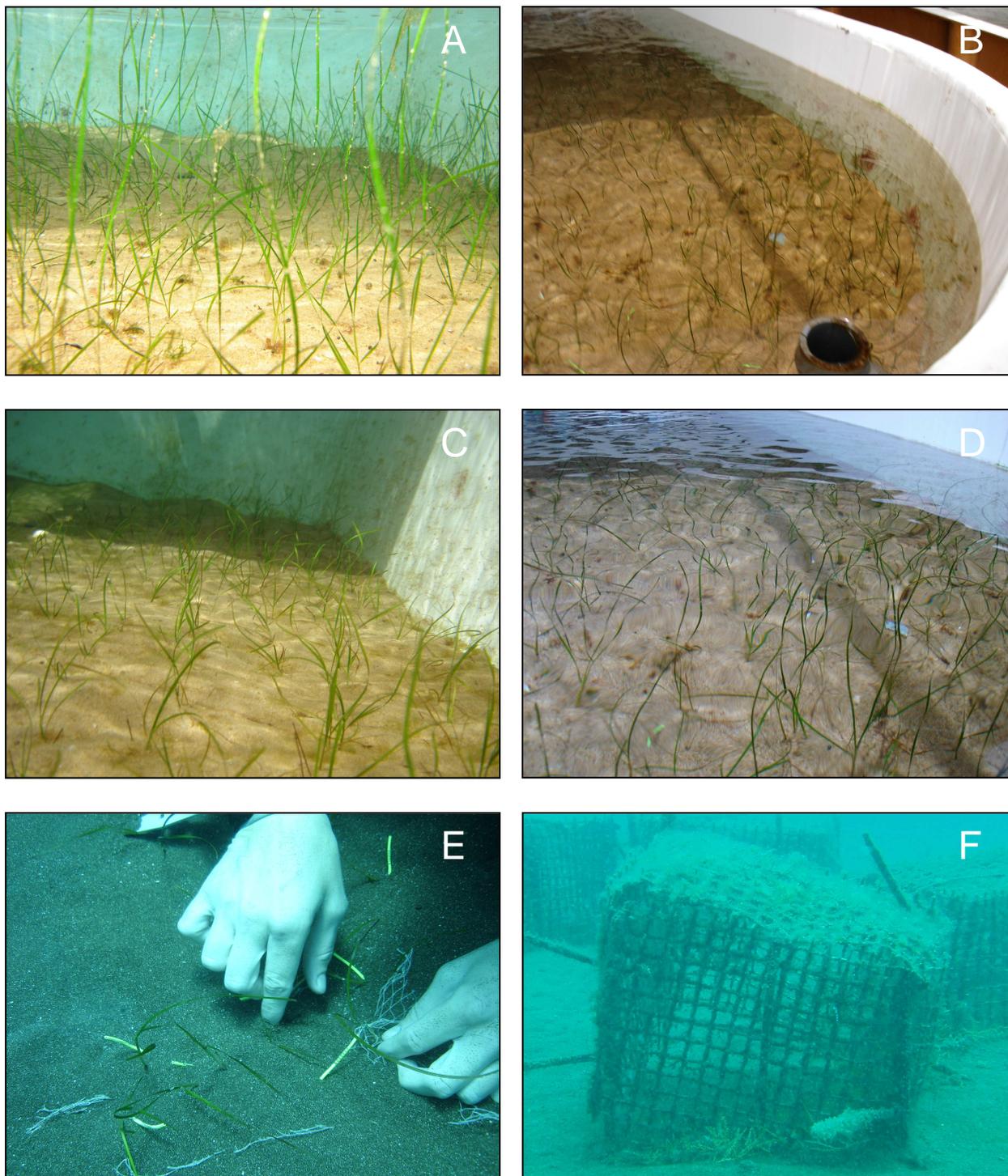


Fig. I.9. Implementación del protocolo de restauración. **A-D**. Aclimatación de plántulas en los tanques de cultivo del ICCM. **E-F**. Trasplante de plántulas atadas a mallas y protegidas por jaulas en una pradera del sureste de Tenerife.

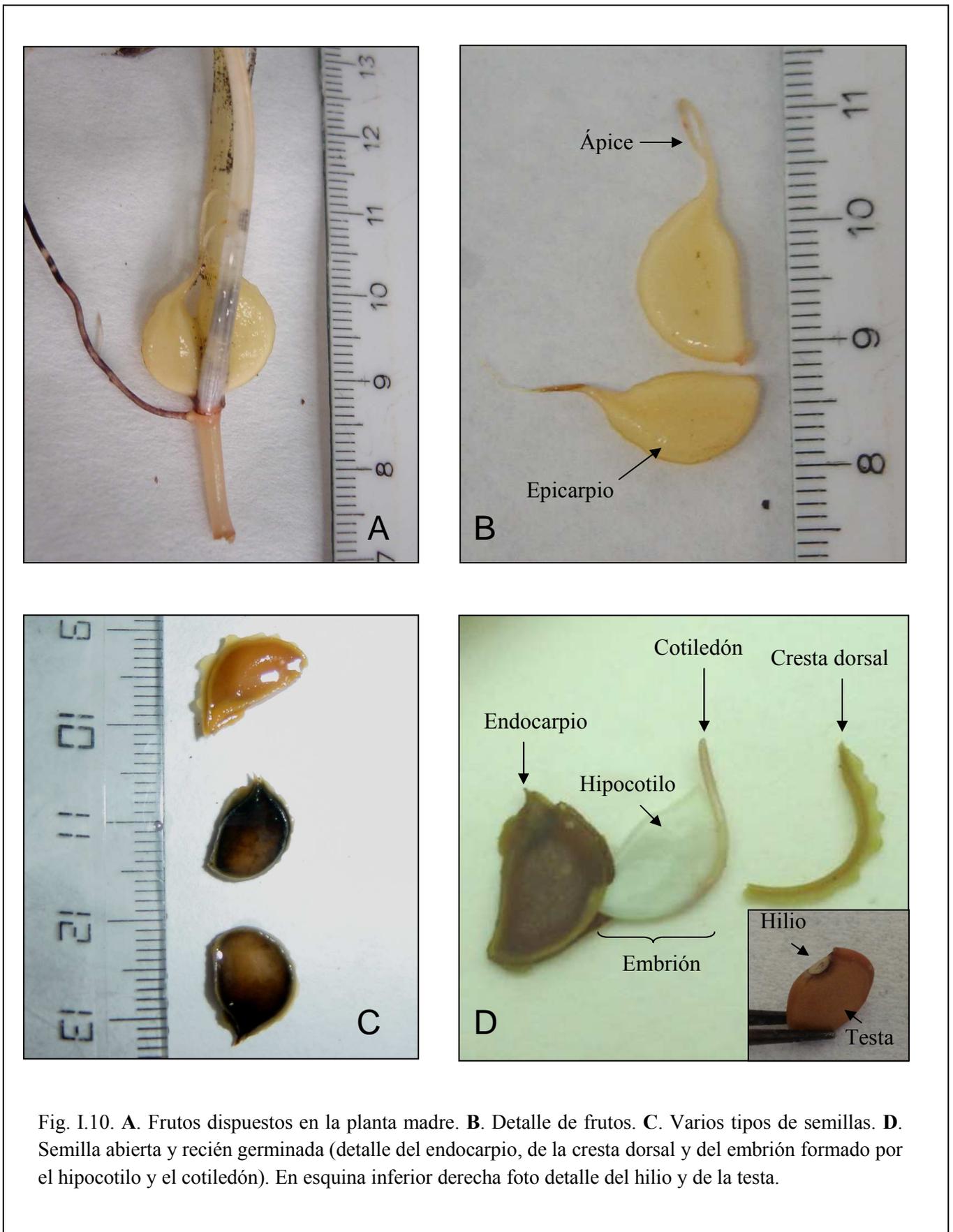


Fig. I.10. A. Frutos dispuestos en la planta madre. B. Detalle de frutos. C. Varios tipos de semillas. D. Semilla abierta y recién germinada (detalle del endocarpio, de la cresta dorsal y del embrión formado por el hipocotilo y el cotiledón). En esquina inferior derecha foto detalle del hilio y de la testa.

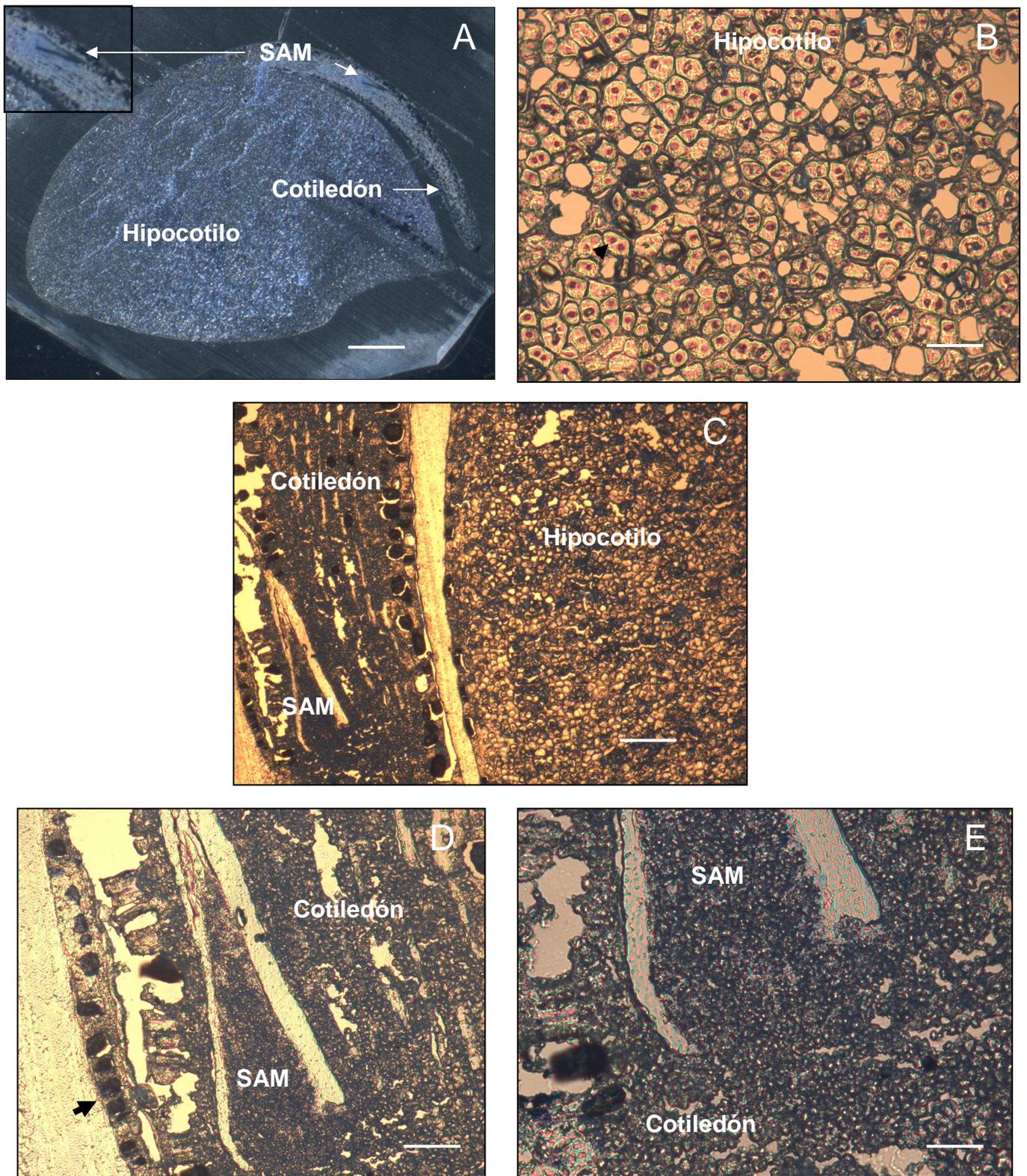
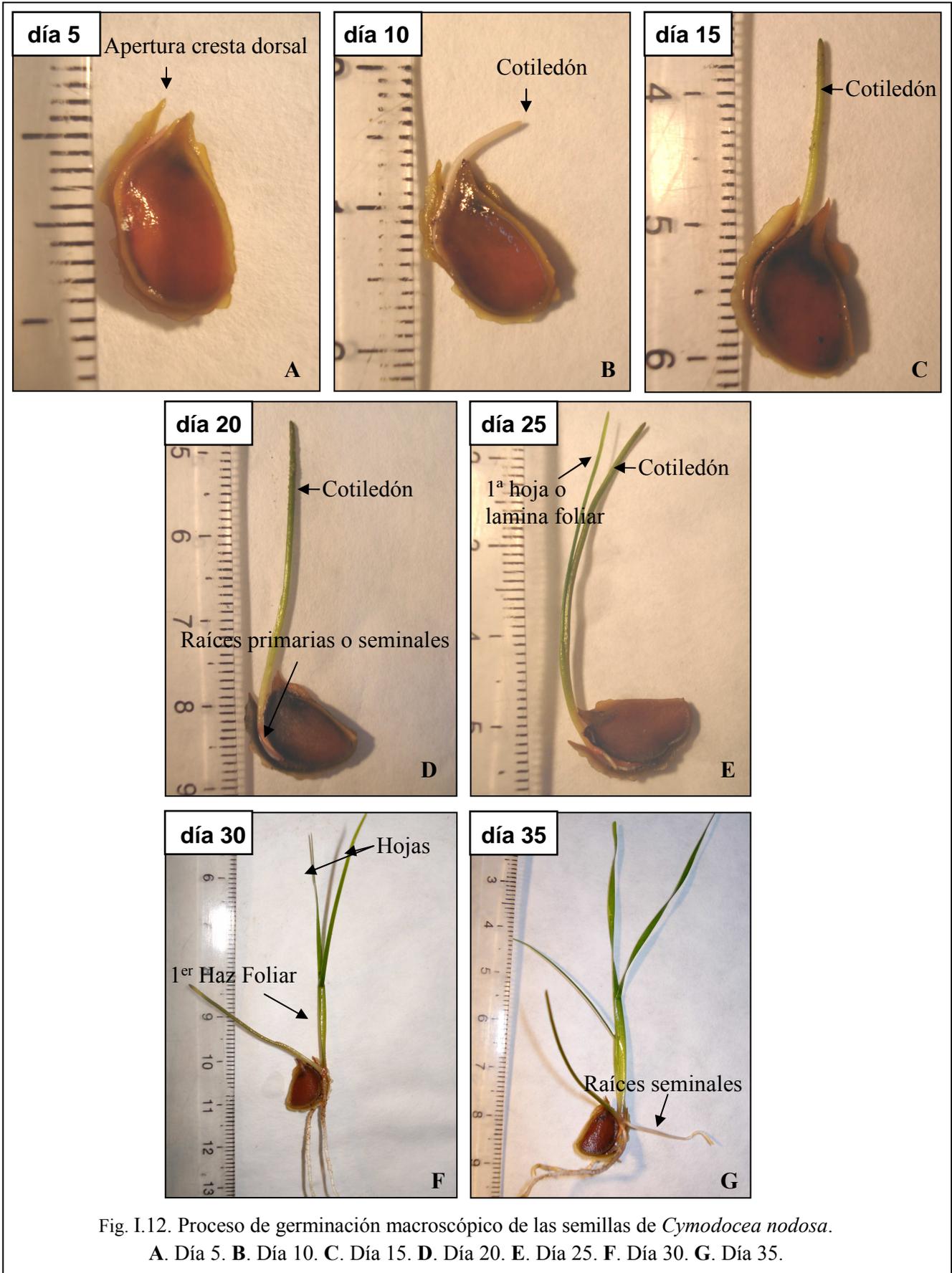


Fig. I.11. **A.** Embrión de la semilla sin germinar, formado por el hipocotilo, el cotiledón y el SAM (*Shoot Apical Meristem*). En esquina superior izquierda detalle del SAM. **B.** Detalle de las células del hipocotilo. La flecha indica células cargadas de sustancias de reserva (almidón). **C-E.** Cotiledón y detalle de la plúmula o SAM inserta en el cotiledón. La flecha en D indica células epidérmicas. Barras = A: 0,175 cm; B: 450 μ M; C: 0,125 cm; D: 450 μ M; E: 215 μ M. Tinción con azul de toluidina (A, D, E) o hematoxilina (B, C).



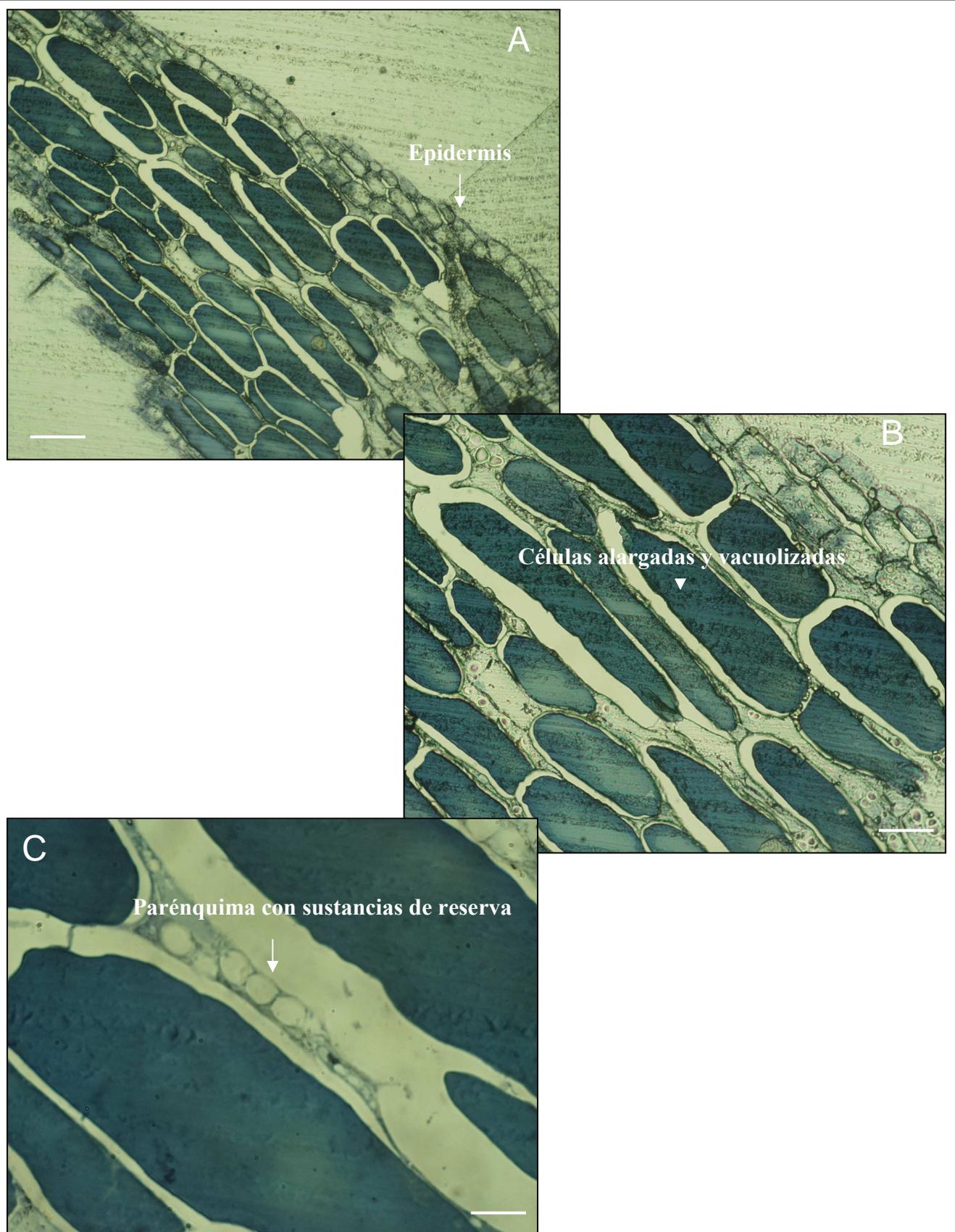


Fig. I.13. Secciones histológicas de la plántula recién germinada. A-C. Ápice del cotiledón. Tinción con azul de toluidina. Barras = A: 350 μ M; B: 180 μ M; C: 50 μ M.

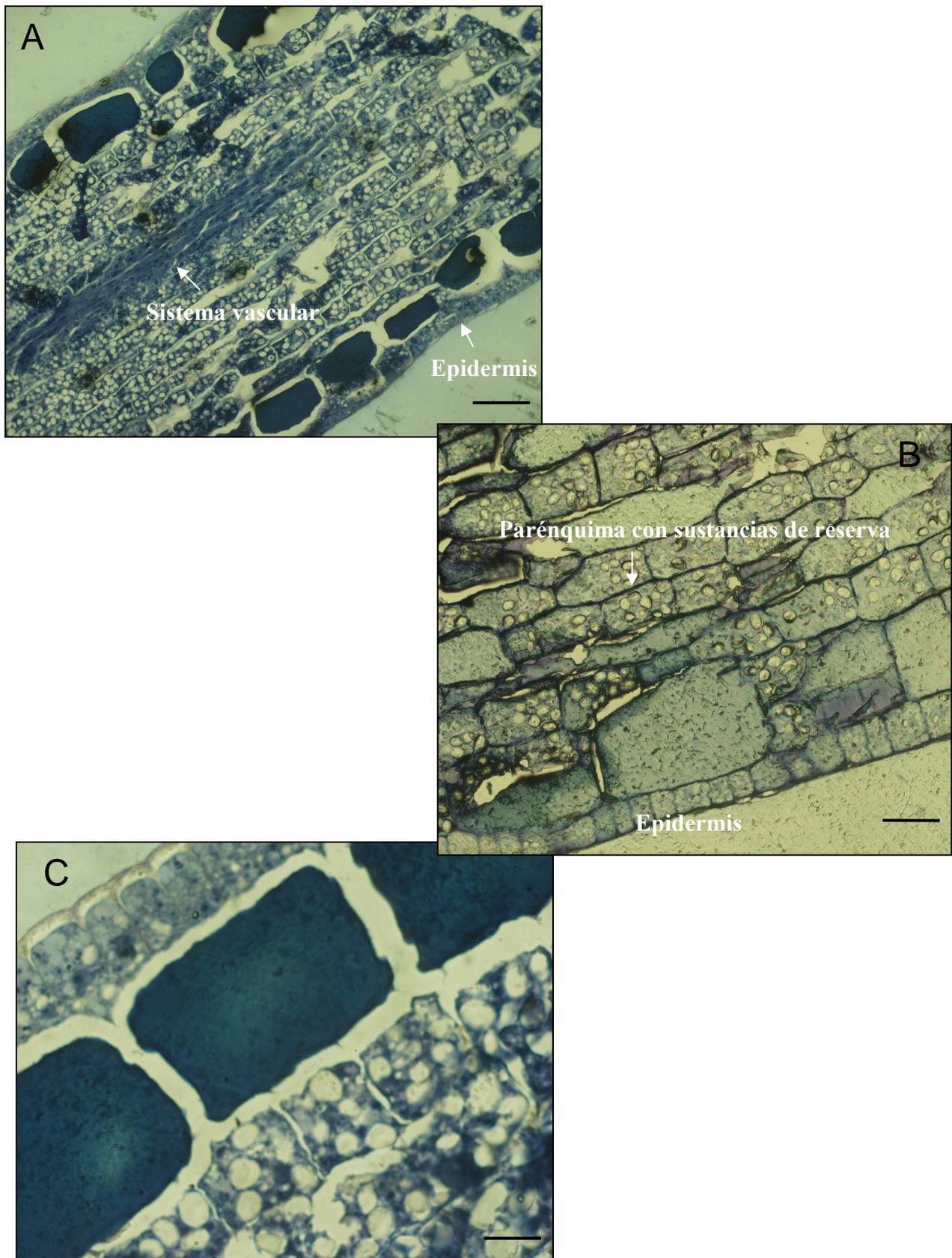


Fig. I.14. Secciones histológicas de la plántula recién germinada. A-C. Zona intermedia del cotiledón. Tinción con azul de toluidina. Barras = A: 385 μ M; B: 185 μ M; C: 90 μ M.

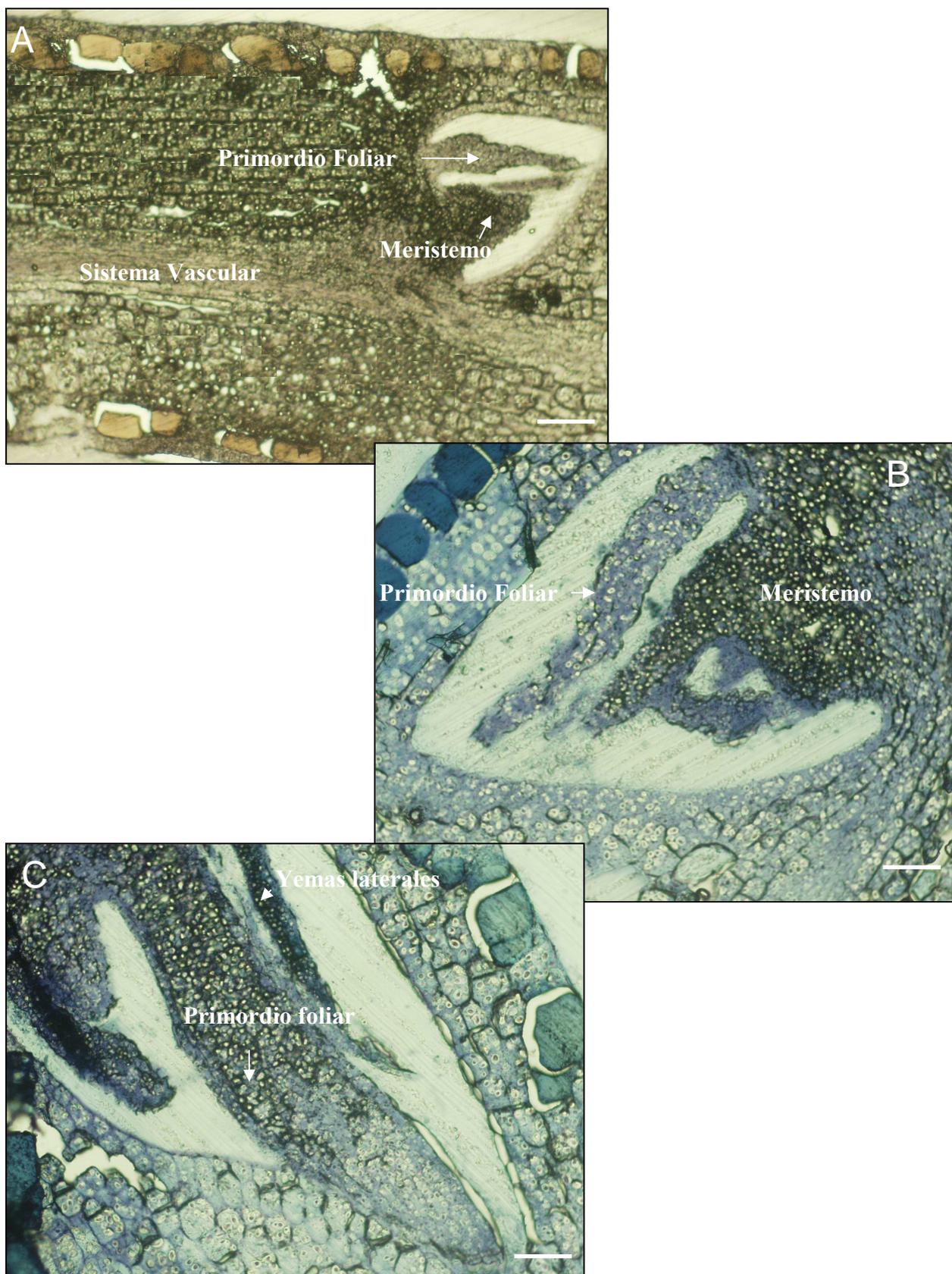


Fig. I.15. Secciones histológicas de la plántula recién germinada. A-C. Detalle del Meristemo Foliar Apical (SAM: *Shoot Apical Meristem*) en la zona intermedia del cotiledón. Tinción con hematoxilina (A) y azul de toluidina (B-C). Barras = A: 367 μ M; B: 192 μ M; C: 192 μ M.

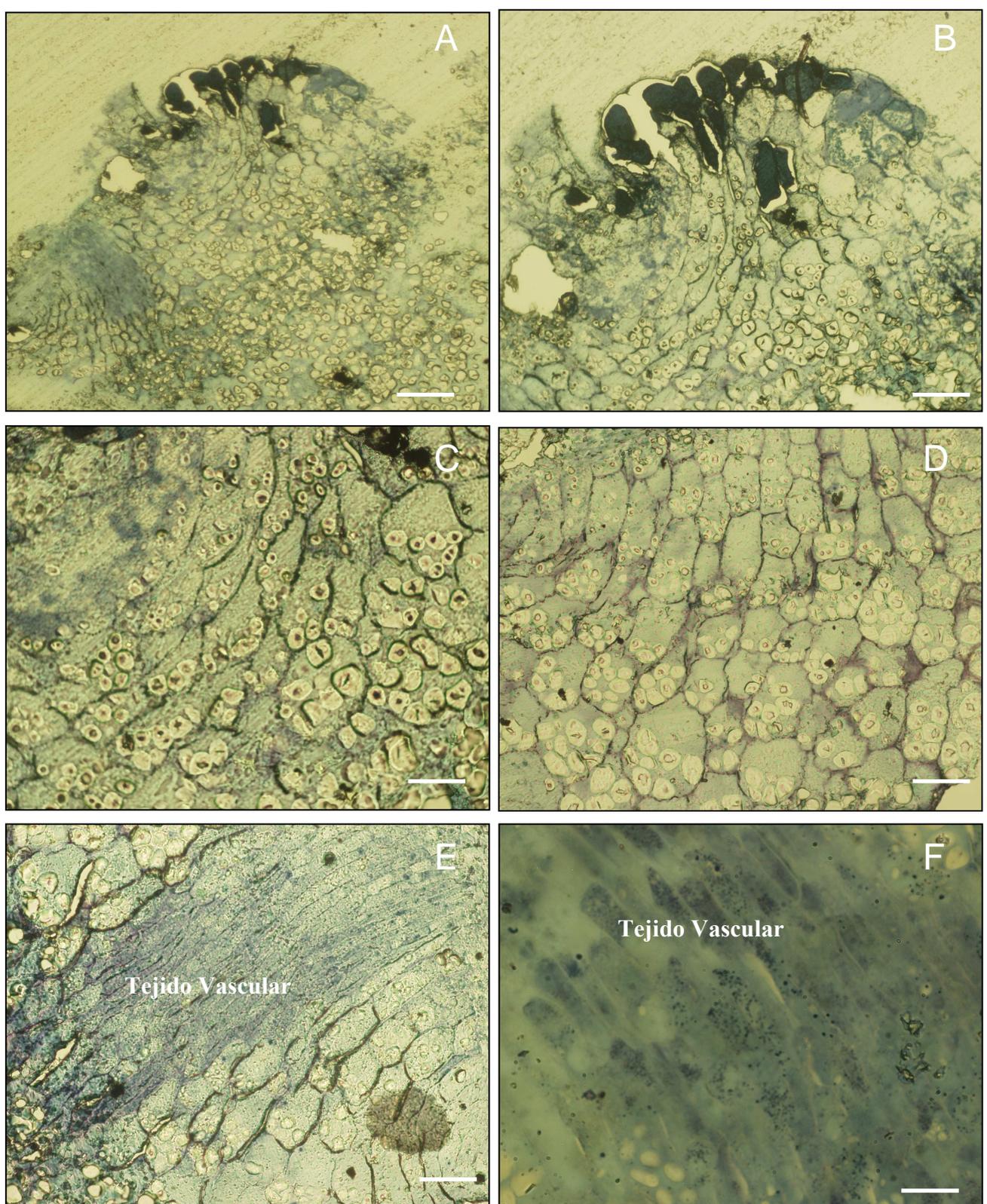


Fig. I.16. Secciones histológicas de la plántula recién germinada. **A-B**. Detalle del meristemo radicular (RAM: *Root Apical Meristem*). **C-D**. Detalle de células que forman el meristemo radicular. **E-F**. Detalle del tejido vascular. Tinción con azul de toluidina. Barras = A: 715 μM ; B: 450 μM ; C: 230 μM ; D: 230 μM ; E: 230 μM ; F: 113 μM .

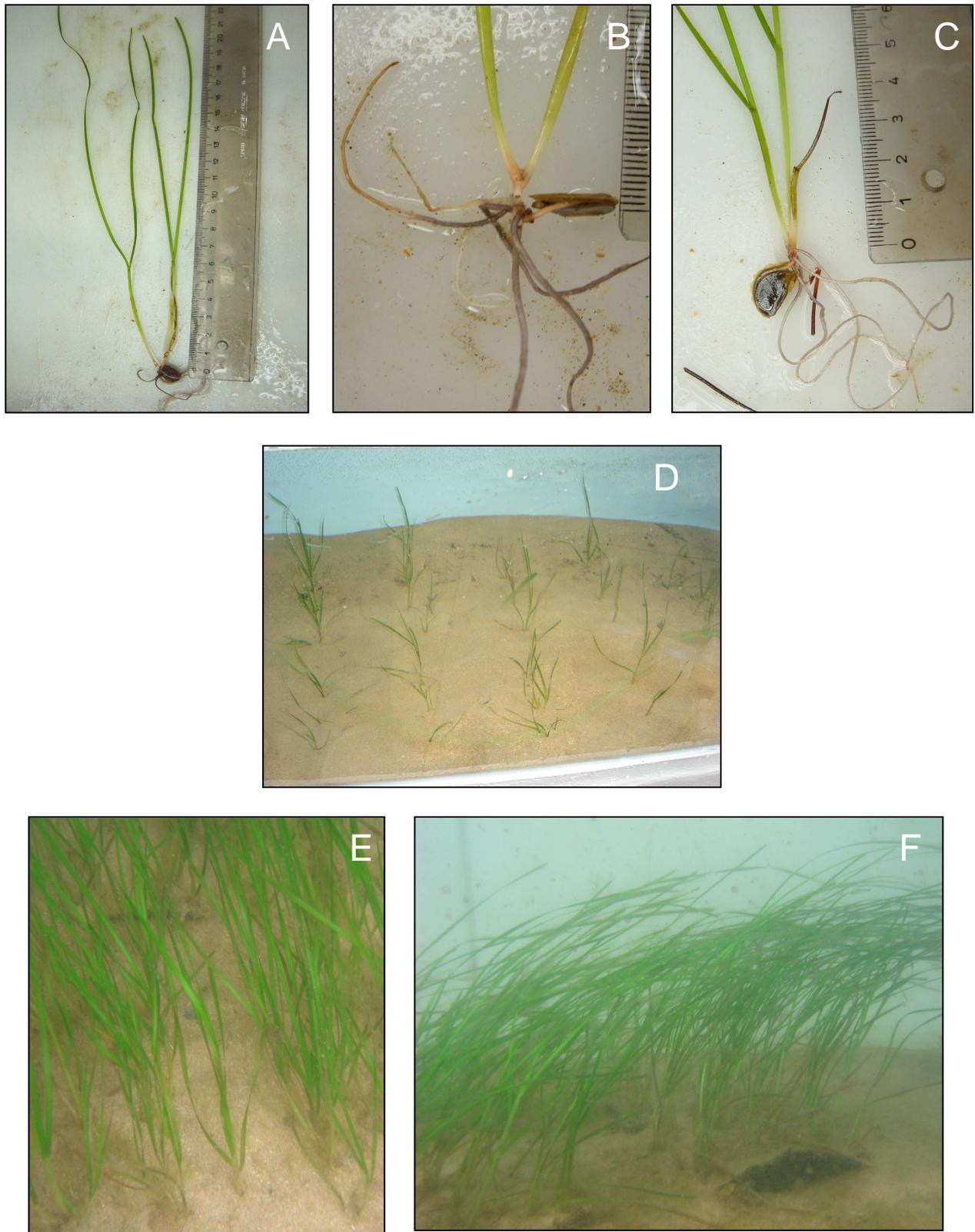


Fig. I.17. **A-D.** Plántulas aclimatadas en los acuarios durante un periodo de 30-45 días. **A.** Plántula con 2 haces desarrollados antes del trasplante al mar. **B-C.** Detalle del entramado de raíces. **D.** Plántulas en el acuario. **E-F.** Plántulas aclimatadas en tanques durante un periodo de 60 días sobre recipientes biodegradables.

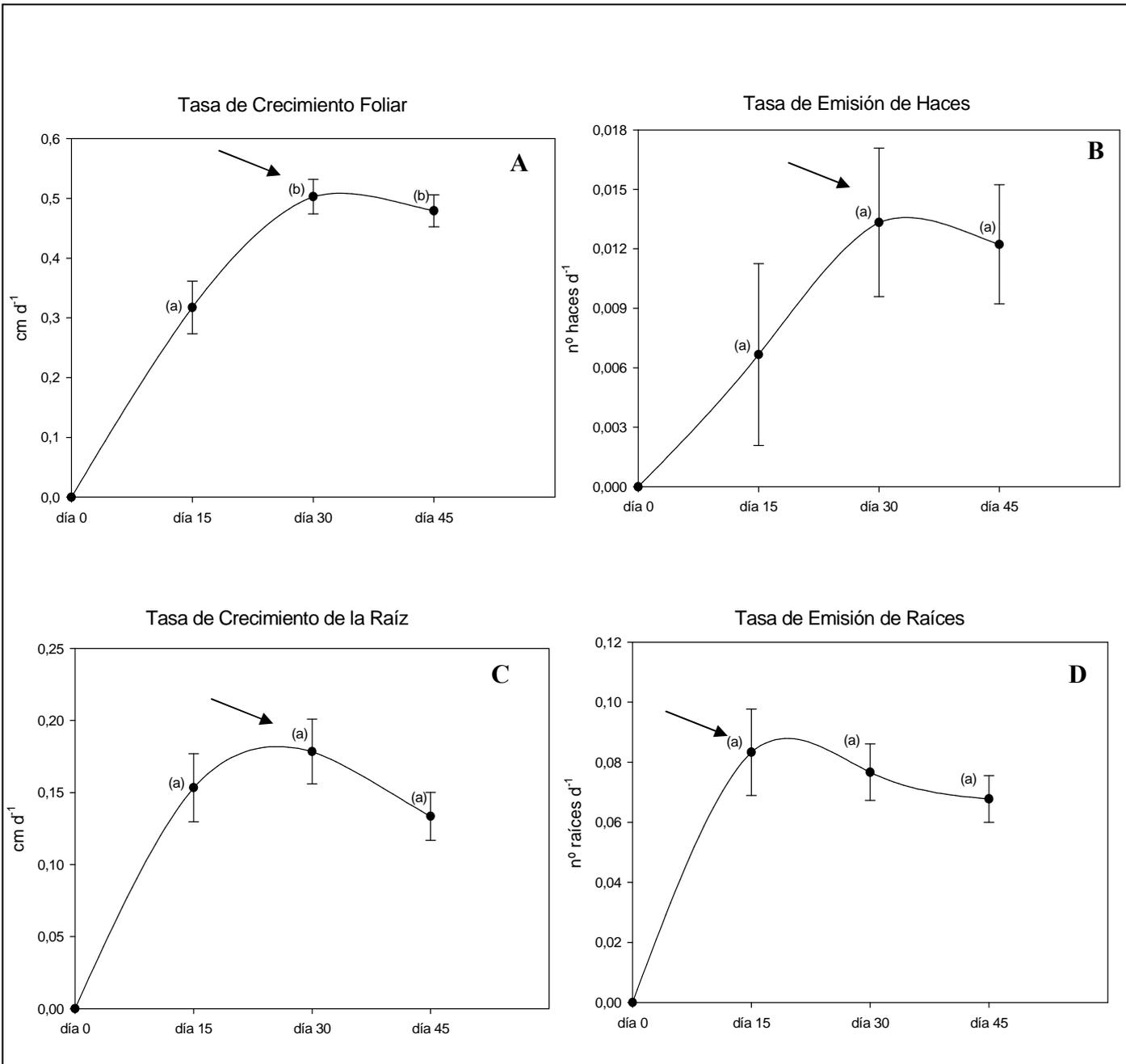


Fig. I.18. **A-D**. Índices de crecimiento en intervalos de tiempo de 15 días y en relación al día de la siembra (media \pm ee), durante el periodo de aclimatación de 45 días ($n = 30$). Distinta letra entre paréntesis hace referencia a grupos significativamente diferentes ($p < 0.05$) (Anova y Test post hoc, Dunett t3, en tasa de crecimiento foliar y tasa de crecimiento de la raíz; Kruskal Wallis y Mann Witney en tasas de emisión de raíces y haces foliares). Las flechas indican la estabilización del crecimiento.

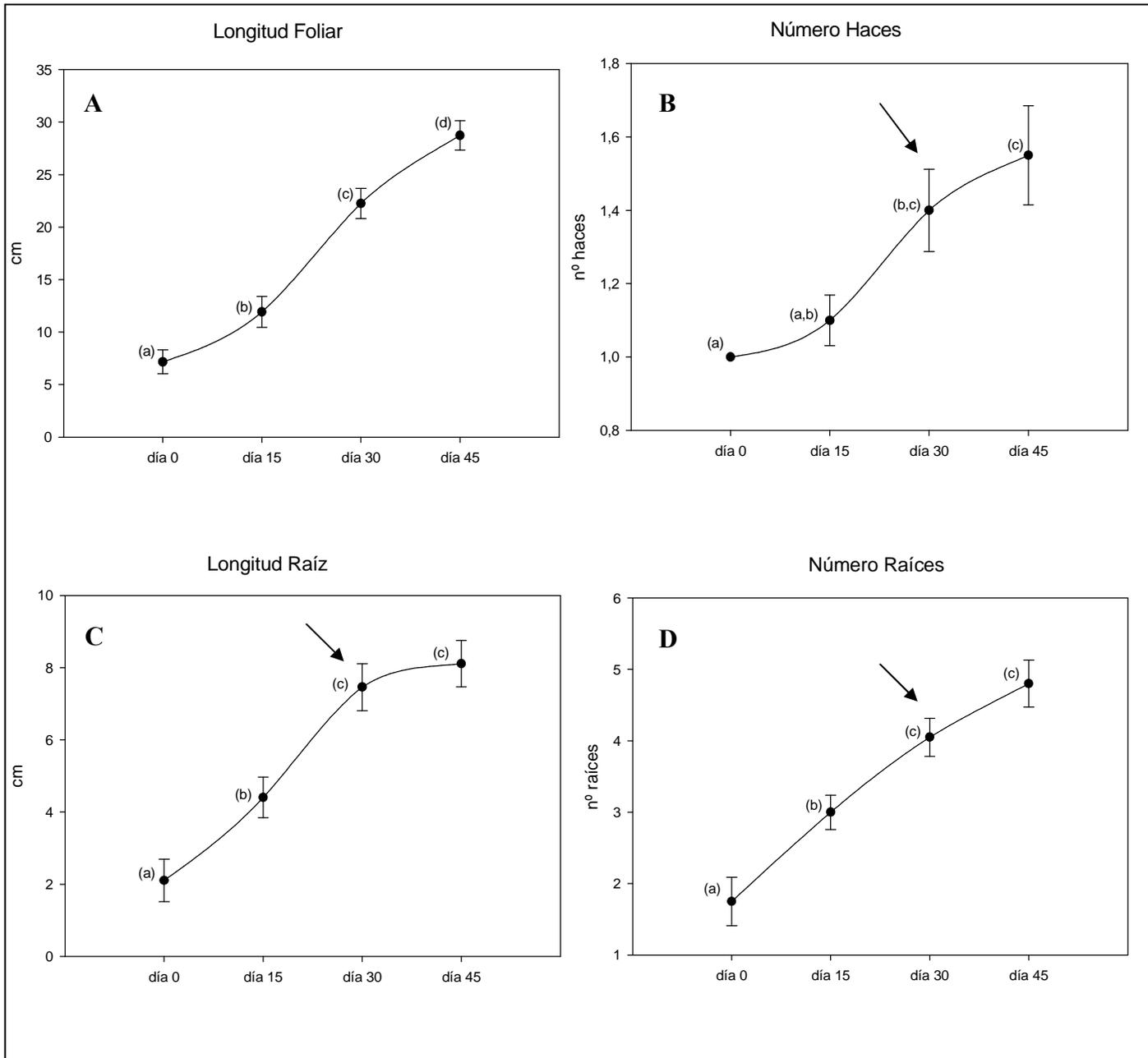


Fig. I.19. **A-D**. Representación del crecimiento de las plántulas en valores de longitud foliar y radicular (cm ± ee), así como en el número de hojas y raíces emitidas, durante el periodo de aclimatación de 45 días para los días 0, 15, 30 y 45 (media ± ee); (n = 30). Distinta letra entre paréntesis hace referencia a grupos significativamente diferentes (p < 0.05) (Anova y Test post hoc, Tukey-HSD, en Longitud Foliar; Kruskal Wallis y Mann Witney en N° Haces, N° Raíces y Longitud Raíz). Las flechas indican la estabilización del crecimiento.

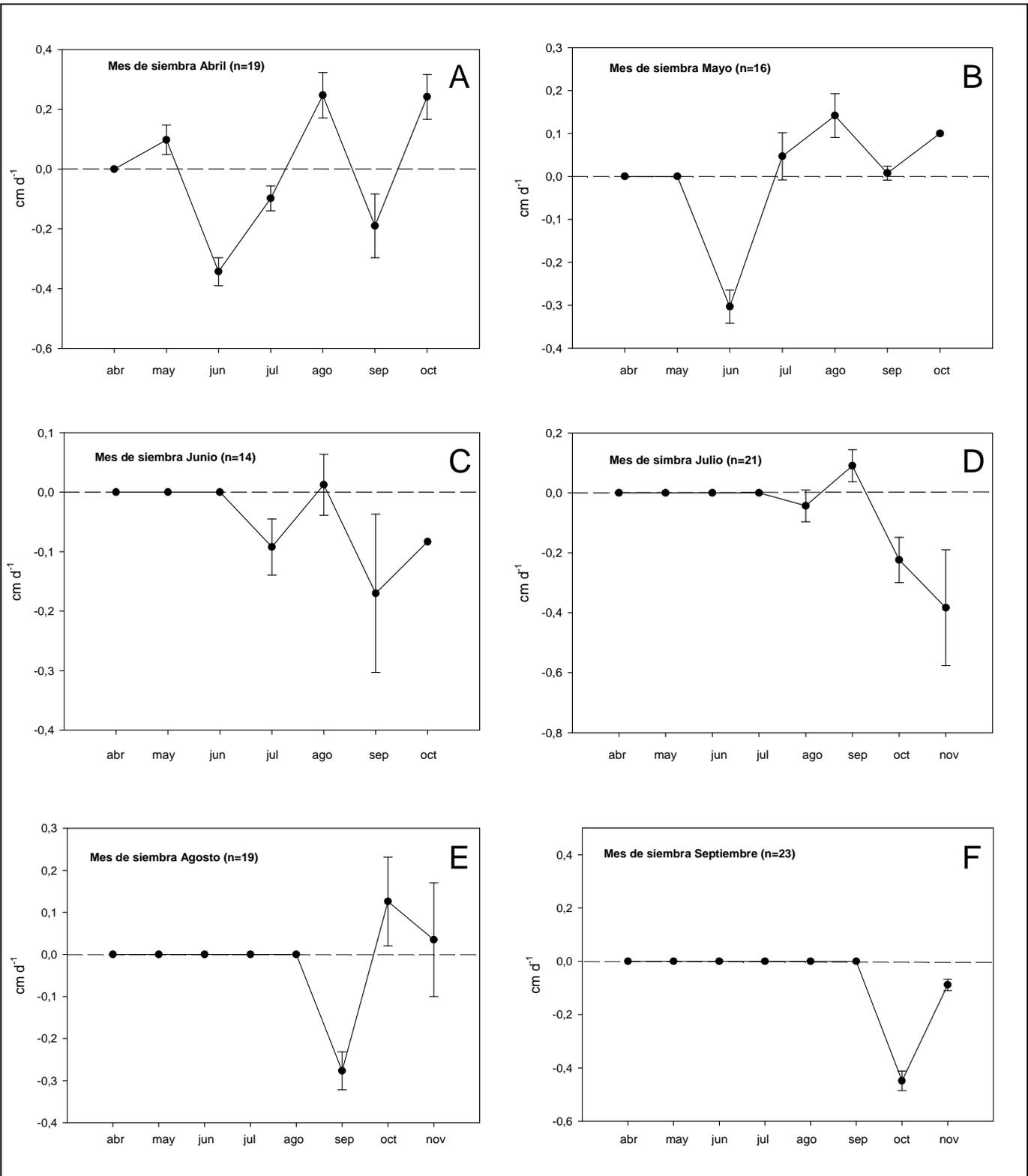


Fig. I.20. Determinación de la época óptima de trasplante a lo largo del año. A-F. Tasas de crecimiento de la hoja larga (cm d⁻¹) respecto al mes anterior para cada mes de siembra.

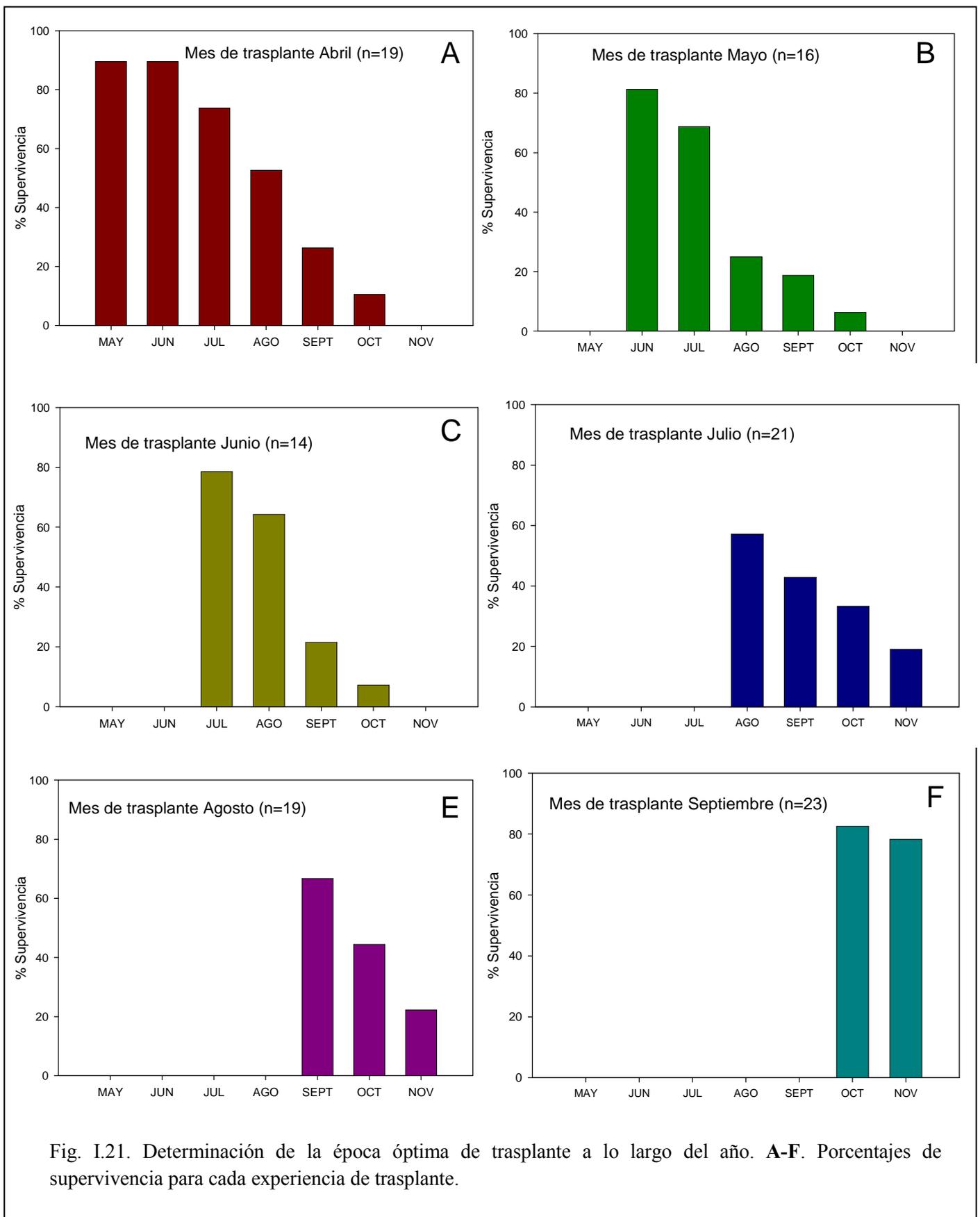


Fig. I.21. Determinación de la época óptima de trasplante a lo largo del año. A-F. Porcentajes de supervivencia para cada experiencia de trasplante.

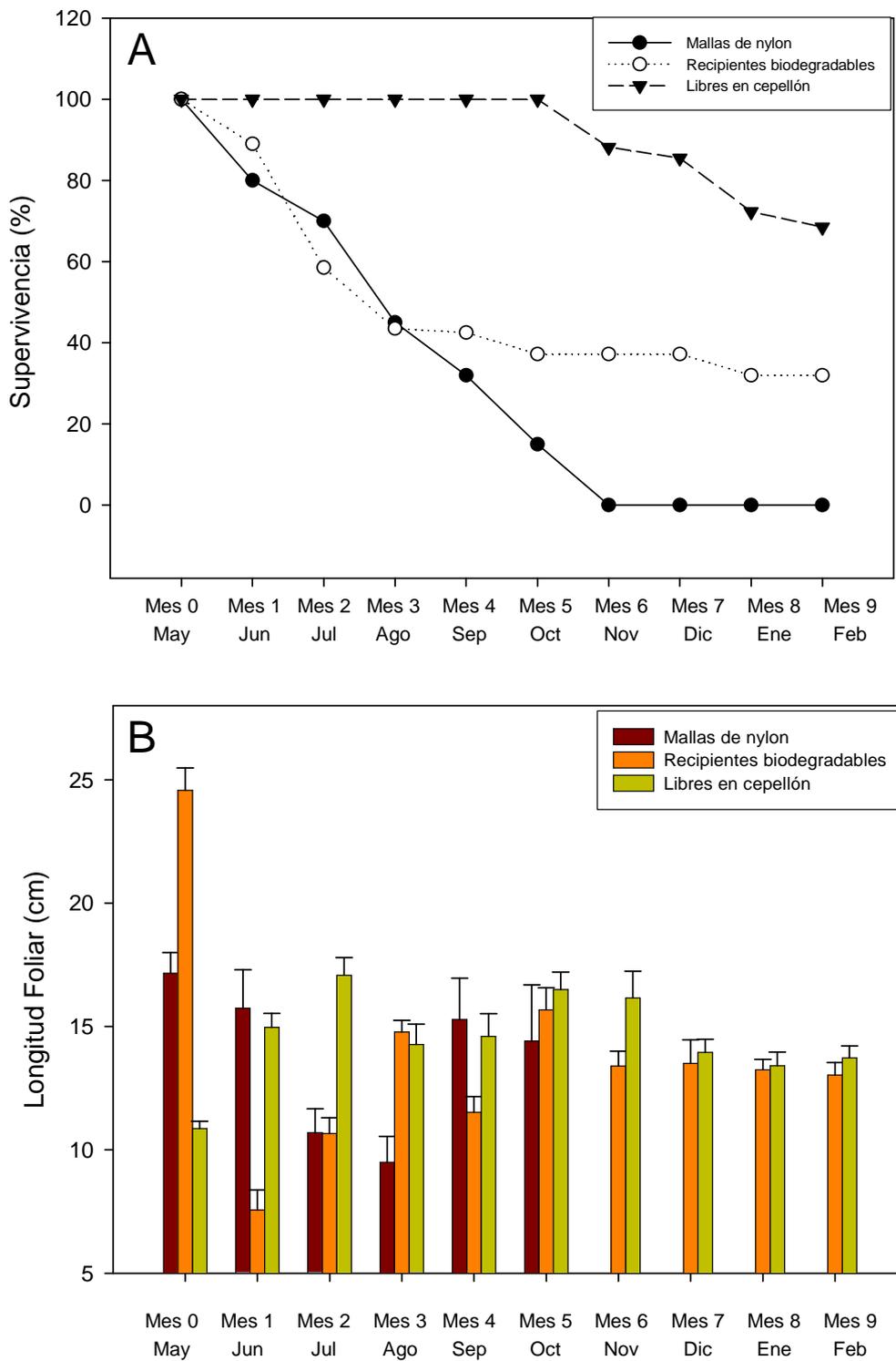


Figura I.22. Experiencias de trasplante con diferentes métodos de anclaje (mallas de nylon, recipientes biodegradables y libres en cepellón) a lo largo de los 9 meses de estudio. **A.** % de supervivencia. **B.** Longitud media foliar (cm ± ee).

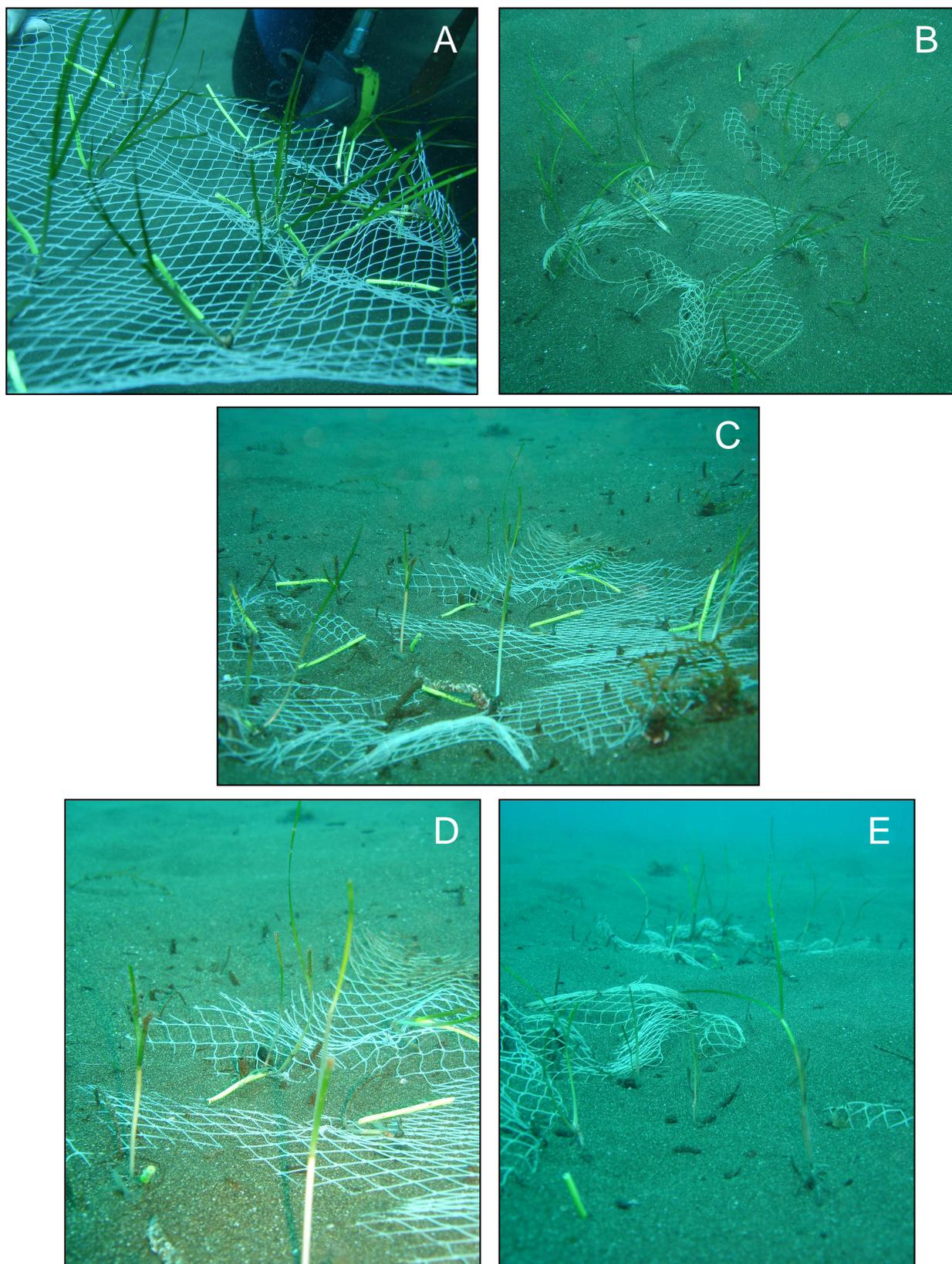


Fig. I.23. Experiencia de trasplante 1. **A-B**. Detalle de la plántula unida a la malla en el momento del trasplante. **C-E**. Detalle de plántulas afectadas por el herbivorismo dos meses después del trasplante.

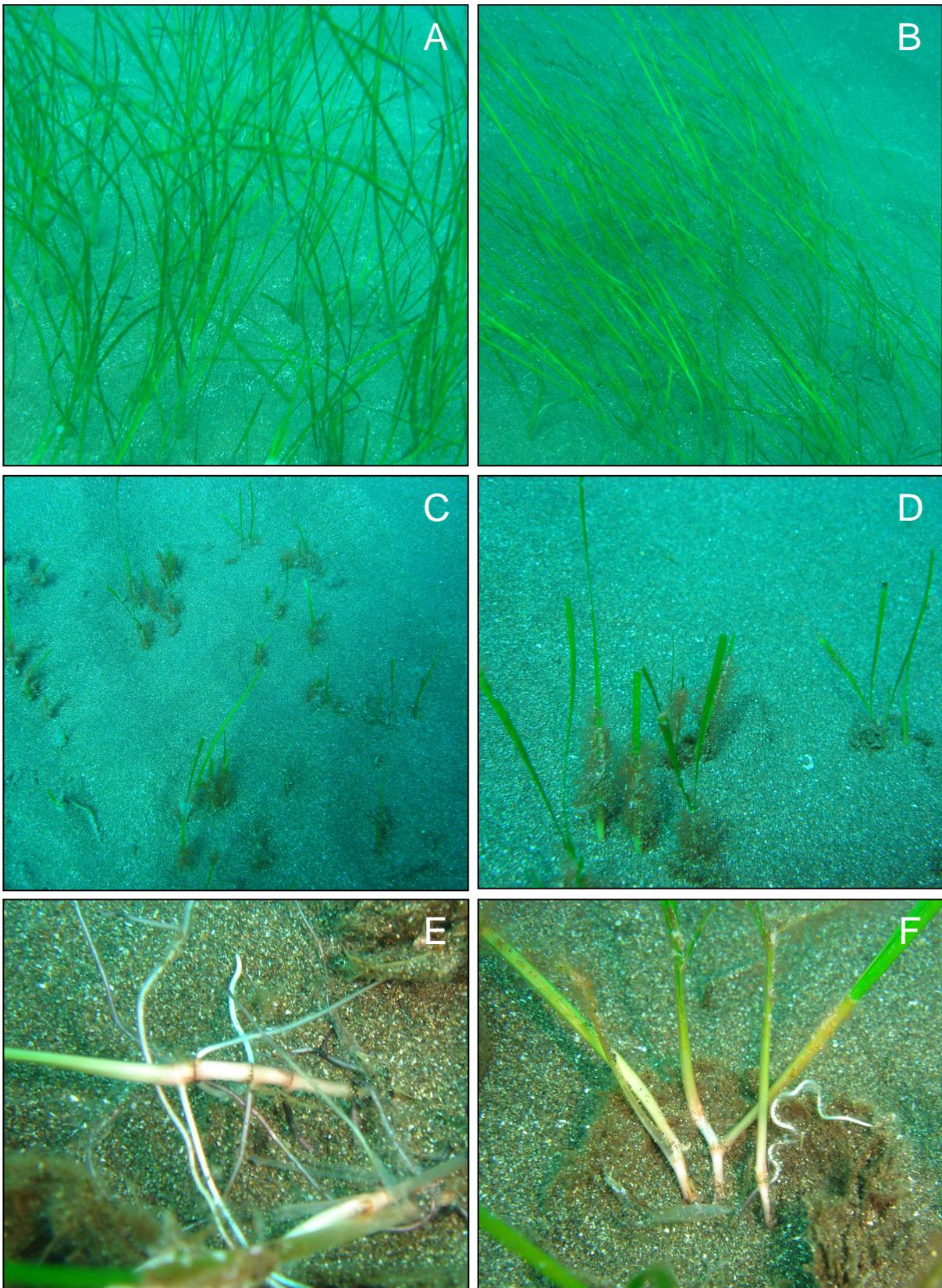


Fig. I.24. Experiencia de trasplante 2. **A-B**. Primer día de trasplante con recipientes biodegradables. **C-D**. Detalle de plántulas afectadas por el herbivorismo un mes después del trasplante. **E-F**. Plántulas recuperadas de la herbivoría dos meses después del trasplante; detalle de raíces y rizoma apicales.

Maite Zarranz Elso

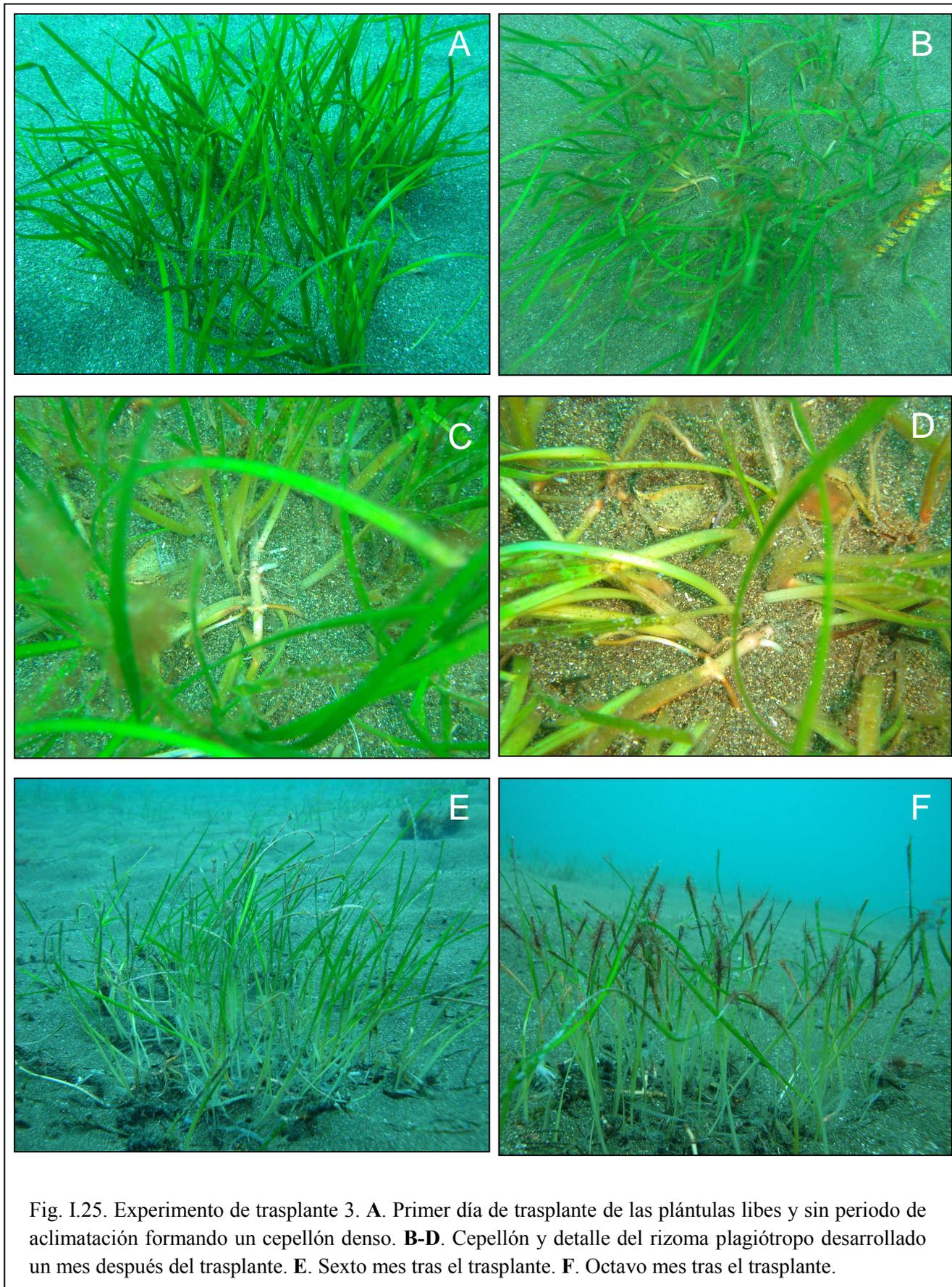
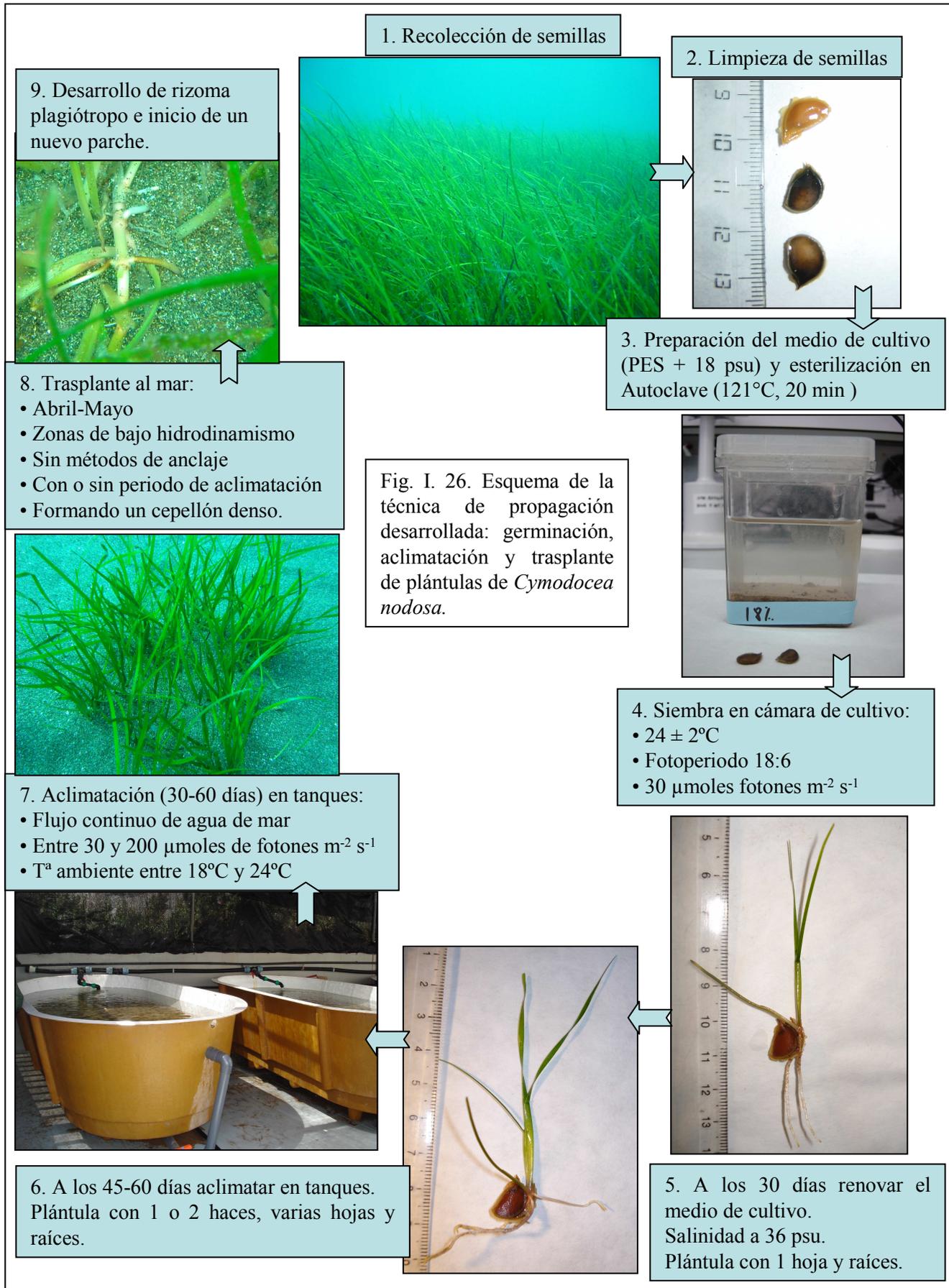


Fig. I.25. Experimento de trasplante 3. **A.** Primer día de trasplante de las plántulas libres y sin periodo de aclimatación formando un cepellón denso. **B-D.** Cepellón y detalle del rizoma plagiótropo desarrollado un mes después del trasplante. **E.** Sexto mes tras el trasplante. **F.** Octavo mes tras el trasplante.



CAPITULO II

Optimización de la técnica de propagación desarrollada:

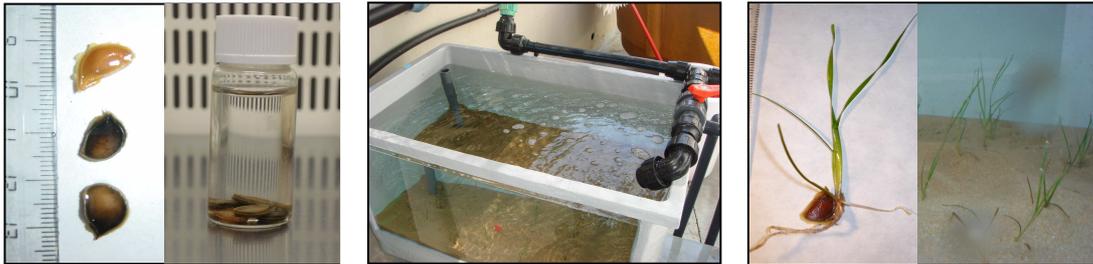
- *Conservación de semillas.*
- *Alteración de los patrones de crecimiento vegetal con reguladores de crecimiento y nutrientes.*



II. 1	Introducción Capítulo II.....	122
II.1.1.	Conservación de las semillas de fanerógamas marinas.....	122
II.1.2.	Tratamiento de las plántulas con reguladores del crecimiento.....	125
II.1.3.	Eliminación de la dominancia apical para favorecer el crecimiento.....	130
II.1.4.	Tratamiento de las plántulas con fertilizantes para mejorar el estatus nutritivo y el crecimiento.....	133
II. 2	Objetivos Capítulo II.....	137
II. 3	Material y Métodos Capítulo II.....	138
II.3.1.	Determinación de las condiciones óptimas de almacenamiento de las semillas de <i>Cymodocea nodosa</i> . Estudio del potencial germinativo.	
a)	Almacenamiento de las semillas en seco.....	138
b)	Almacenamiento de las semillas en agua de mar.....	138
c)	Potencial germinativo de semillas recolectadas de la naturaleza.....	139
II.3.2.	Optimización del crecimiento y desarrollo de las plántulas tratadas con reguladores del crecimiento.....	139
II.3.3.	Efecto de la dominancia apical en el crecimiento de las plántulas.....	141
II.3.4.	Optimización del crecimiento y desarrollo de las plántulas tratadas con fertilizantes y análisis del contenido en nutrientes.....	142
II. 4	Resultados Capítulo II	144
II.4.1.	Determinación de las condiciones óptimas de almacenamiento de las semillas de <i>Cymodocea nodosa</i> . Estudio del potencial germinativo.	

a) Almacenamiento de las semillas en seco.....	144
b) Almacenamiento de las semillas en agua de mar.....	144
c) Potencial germinativo de semillas recolectadas de la naturaleza.....	144
II.4.2. Optimización del crecimiento y desarrollo de las plántulas tratadas con reguladores del crecimiento.	145
II.4.3. Efecto de la dominancia apical en el crecimiento de las plántulas.....	146
II.4.4. Optimización del crecimiento y desarrollo de las plántulas tratadas con fertilizantes y análisis del contenido en nutrientes.....	146
II. 5 Discusión Capítulo II.....	149
II.5.1. La especie <i>Cymodocea nodosa</i> produce semillas recalcitrantes.....	149
II.5.2. Condiciones de almacenamiento de las semillas recalcitrantes.....	150
II.5.3. La dormancia en semillas de <i>Cymodocea nodosa</i>	154
II.5.4. Aplicación de las técnicas desarrolladas para mejorar la recalcitrancia de las semillas y la pérdida del potencial germinativo en la población.....	165
II.5.5. Efecto inhibitorio de los reguladores del crecimiento en las plántulas de <i>Cymodocea nodosa</i>	167
II.5.6. Ausencia de dominancia apical en las plántulas de <i>C. nodosa</i>	170
II.5.7. Optimización del estatus nutritivo, del crecimiento y del desarrollo de las plántulas de <i>C. nodosa</i> tratadas con fertilizantes.....	171
II. 6 Conclusiones Capítulo II.....	177
II. 7 Bibliografía Capítulo II.....	179
II. 8 Anexo Capítulo II. Figuras.....	191

II.1. INTRODUCCIÓN CAPÍTULO II



II.1.1. La conservación de las semillas puede contribuir a mejorar los planes de restauración de praderas de fanerógamas marinas.

Las semillas son los únicos propágulos que contribuyen a la diversidad genética entre generaciones de plantas y son uno de los principales recursos para la conservación del germoplasma vegetal, debido a que pueden almacenarse vivas por largos periodos de tiempo (Vázquez-Yanes *et al.*, 1997). La capacidad de las semillas para permanecer vivas y viables, sin germinar, por diferentes periodos en el suelo se conoce como **longevidad ecológica**. Normalmente, en climas húmedos y cálidos, las semillas tienden a germinar rápidamente, ya que en el momento de la dispersión poseen un alto contenido de humedad y un metabolismo activo. En otros ambientes menos favorables, las semillas tienen una longevidad ecológica mayor ya que deben esperar las condiciones adecuadas para la germinación. En estos casos, el embrión de la semilla presenta un periodo de quiescencia en el que sufre una deshidratación profunda con interrupción total del metabolismo. A los efectos de los planes de restauración o conservación de germoplasma vegetal, podemos intervenir en la capacidad de las semillas para permanecer viables en condiciones óptimas de almacenamiento artificial, lo que se conoce como **longevidad potencial** de las semillas. Las semillas son liberadas al medio con diferentes niveles de humedad, composición química y tasa metabólica, lo cual afectará a su longevidad potencial (Vázquez-Yanes *et al.*, 1997).

De forma general, existen tres tipos de semillas según su capacidad para ser almacenadas, y la duración potencial de su viabilidad:

1- Semillas ortodoxas. Son la mayoría de las semillas con longevidad ecológica media y larga, que adquieren tolerancia a la desecación durante el desarrollo, y pueden deshidratarse hasta un 5% de contenido de humedad para almacenarse a bajas temperaturas (-18°C) por periodos prolongados (Pammenter & Berjak, 2000). Conforme las semillas ortodoxas se desarrollan adquieren mecanismos para tolerar la desecación y la rehidratación (Pammenter & Berjak, 1999, 2000; Walters, 2000). Algunos de estos mecanismos son la acumulación de reservas insolubles, la reducción del volumen de agua en las vacuolas y la síntesis de moléculas de protección. Además, en el embrión se desdiferencian y desaparecen las mitocondrias y se desactiva el metabolismo (disminución de la tasa respiratoria), hasta que finalmente se activan mecanismos de protección, como la vitrificación (a partir de ratios adecuados de sacarosa y

oligosacaridos) o la activación de las proteínas LEA (*Late Embryogenesis Abundant*) (Pammenter & Berjak, 1999, 2000; Walters, 2000). Además, durante el proceso de secado se cree que están operativos sistemas antioxidantes, aspecto muy importante para la recuperación de las semillas tras la desecación y la rehidratación (Pammenter & Berjak, 1999, 2000).

2- Semillas recalcitrantes. Son normalmente las semillas de vida corta sensibles a la desecación. Son aquellas que contienen altos porcentajes de agua, de 0.4 a 4 gramos de agua por gramo de peso seco de materia (g/g), y permanecen metabólicamente activas durante la dormancia (Pammenter & Berjak, 2000). Deben almacenarse en un ambiente húmedo para evitar su desecación, y a una temperatura lo suficientemente baja como para impedir la germinación y el desarrollo de microorganismos, pero suficientemente cálida para evitar el daño por frío, ya que son sensibles a las bajas temperaturas (Piriz-Carrillo *et al.*, 2004). Conforme se desarrollan, las semillas recalcitrantes no adquieren tolerancia a la desecación y carecen de todos o parte de los mecanismos de tolerancia que han adquirido las semillas ortodoxas durante su maduración (Pammenter & Berjak, 1999, 2000; Walters, 2000). Presentan una estructura típica con vacuolas grandes que no disminuyen su tamaño ni su contenido en agua durante la maduración, lo que provoca la muerte por daños físicos durante el proceso de desecación (Pammenter & Berjak, 1999, 2000). Acumulan, además, sustancias de reserva en forma de azúcares solubles, y no disminuyen el número de mitocondrias ni su tasa metabólica. Las semillas recalcitrantes son metabólicamente activas y presentan altas tasas respiratorias en comparación con las ortodoxas.

3- Semillas intermedias. Presentan cierta sensibilidad a la desecación, y su longevidad se reduce con temperaturas bajas (por debajo de 5°C) por lo que deben almacenarse hasta un 7-10% de humedad y a temperatura ambiente (Vázquez-Yanes *et al.*, 1997).

En el caso de las fanerógamas marinas no se han diseñado específicamente estudios de conservación de semillas para preservar germoplasma vegetal. Sin embargo, en varias publicaciones se describen las condiciones en las que se ha ensayado el almacenamiento de las semillas de diferentes especies (Tabla II.1).

Tabla II.1. Recopilación bibliográfica de la que se pueden extraer datos sobre el almacenamiento de semillas de distintas especies de fanerógamas marinas. nd = no data.

Referencia	Especie	Condiciones de almacenamiento	Periodo de almacenamiento	Porcentaje de germinación
Churchill (1983)	<i>Zostera marina</i>	En sedimento con agua de mar (30 psu) y temperatura ambiente.	22 meses	55% de germinaciones.
Koch & Seelinger (1988)	<i>Ruppia maritima</i>	Estratificadas en agua de mar a 7 y -5°C, o secadas y almacenadas a 7°C.	hasta 12 meses	Máx. germinación (60%) a los 2 meses de almacenamiento en seco a 7°C.
McMillan (1983a, 1991)	<i>Halodule wrightii</i>	En agua de mar artificial, condiciones de luz y 24-27°C	3 años y 10 meses	Máx. germinación el 3 ^{er} año con un 40%. 2% de germinación tras 3 años y 10 meses.
McMillan (1991)	<i>Syringodium filiforme</i>	En agua de mar artificial, condiciones de luz y 24-27°C	4 años y un mes	Máx. germinación el 3 ^{er} año con un 50%. Menos del 0.5% el quinto año.
	<i>Halodule uninervis</i>	En agua de mar artificial, condiciones de luz y 24-27°C	3 años y 5 meses	nd.
	<i>Halophila engelmannii</i>	En agua de mar artificial, oscuridad y 24-27°C	2 años	70% de germinaciones.
	<i>Halophila decipiens</i>	En agua de mar artificial, oscuridad y 24-27°C	11 meses	Germinan y son viables
Caye <i>et al.</i> (1992)	<i>Cymodocea nodosa</i>	En acuarios a 38 psu de salinidad	18 meses	nd.
Conacher <i>et al.</i> (1994)	<i>Zostera capricorni</i>	En agua de mar aireada y temperatura de 5-10°C	50 días	El 58 ± 10% de las semillas son viables.
Reed <i>et al.</i> (1998)	<i>Phyllospadix torreyi</i>	En condiciones de frío (4°C) y oscuridad	83 días	70% de germinaciones.
Granger <i>et al.</i> (2002)	<i>Zostera marina</i>	En tanques con flujo continuo de agua de mar y temperatura ambiente	durante meses	nd.
Ailstock & Shafer (2006)	<i>Ruppia maritima</i>	En agua a 21°C, aireación y 15 psu	9 meses	70% de germinación al transferirlas a 0 psu
	<i>Potamogeton perfoliatus</i>	En agua a 4°C, aireación y 15 psu	9 meses	85.5% de germinación al transferirlas a 0 psu
Belzunce <i>et al.</i> (2008)	<i>Posidonia oceanica</i>	En agua de mar a 5°C y oscuridad	11 y 17 días	0% supervivencia

Se puede observar en esta tabla que no existe un método estandarizado para la conservación de las semillas y los requerimientos varían en función de la especie. En general se mantienen en agua de mar a distintas salinidades, variando además las condiciones de temperatura, luz/oscuridad y oxígeno. Las especies más longevas resultaron ser *Syringodium filiforme*, *Halodule wrightii* y *H. uninervis*, que continuaban germinando 4 y 3 años después de la recolección (McMillan, 1991). La más recalcitrante parece ser *Posidonia oceanica*, que tras almacenar sus semillas durante 11 o 17 días en agua de mar a 5°C perdían completamente la capacidad germinativa (Belzunce *et al.*, 2008). **Respecto a *Cymodocea nodosa***, únicamente encontramos una cita en relación al mantenimiento en acuarios de las semillas durante un cierto número de meses (Caye *et al.*, 1992), pero **no se mencionan las condiciones de almacenamiento necesarias para mantener el potencial germinativo durante el mayor tiempo, ni la naturaleza recalcitrante u ortodoxa de estas semillas.**

II.1.2. *El tratamiento de las plántulas con sustancias reguladoras del crecimiento puede acelerar el desarrollo y aumentar la biomasa foliar y radicular con las que asegurar la supervivencia de las plántulas en el trasplante.*

Las hormonas vegetales son sustancias que se sintetizan en un determinado lugar de la planta y se traslocan a otro donde actúan a muy bajas concentraciones regulando el crecimiento, desarrollo y metabolismo del vegetal (Salisbury & Ros, 1992). El término "sustancias reguladoras del crecimiento" es más general y abarca a las sustancias tanto de origen natural como sintetizadas en laboratorio, que determinan respuestas a nivel de crecimiento, metabolismo o desarrollo en la planta. Se conocen cinco grupos principales de hormonas vegetales o fitohormonas: las **auxinas**, las **citoquininas**, las **giberelinas**, el **etileno** y el **ácido abscísico**. Todas ellas actúan coordinadamente para regular el crecimiento en las diferentes partes de una planta. Otras sustancias que también pueden clasificarse como fitohormonas son: las **poliaminas**, los **brasinosteroides**, el **ácido salicílico**, los **jasmonatos**, las **oligosacarinas** y el **óxido nítrico** entre otros.

La existencia de las **Auxinas** fue demostrada por F.W. Went en 1928. Posteriormente, algunos investigadores fueron capaces de aislar e identificar la auxina que se encuentra de forma natural en las plantas y que resultó ser el ácido indol-3-acético (AIA). Las auxinas se producen principalmente en los meristemos apicales de los brotes y de allí se mueven a otras partes de la planta, siempre en dirección de tallo a raíz

(basipétala) por medio de un mecanismo dependiente de energía. Las más altas concentraciones de auxinas se localizan en las regiones meristemáticas en crecimiento, pero también en los embriones, en las hojas jóvenes, las flores y los frutos. A continuación resumimos algunos de los efectos fisiológicos producidos por las auxinas (Salisbury & Ros, 1992; Azcón-Bieto & Talón, 2001; Barceló-Coll *et al.*, 2001):

- Estimulan la división celular y el crecimiento del cambium en plantas leñosas.
- Estimulan la elongación celular incrementando la extensibilidad de la pared celular: hipótesis del crecimiento ácido.
- Influyen en la diferenciación del tejido vascular durante el alargamiento del tallo.
- Pueden estimular el crecimiento de las raíces primarias y adventicias.
- Influyen en las respuestas fototrópica y geotrópica de las plantas.
- Responsables de la dominancia apical. El flujo de la auxina en dirección tallo-raíz inhibe el desarrollo de las yemas laterales.
- Retrasan la senescencia de las hojas. El movimiento de la auxina desde la lámina foliar hacia la base del pecíolo parece que también previene la abscisión foliar.
- Regulan la formación, crecimiento y maduración de los frutos en algunas plantas.
- Promueven la floración y estimulan el crecimiento de algunas partes florales.
- Estimulan la producción de etileno en altas concentraciones.

Dentro de las auxinas naturales se encuentran, además del AIA, el 4-cloroIAA (ácido 4-cloroindol-3-acético), el PAA (ácido fenilacético) y el IBA (ácido indolbutírico). Dentro de las auxinas sintéticas destacan el 2,4-D (ácido 2,4-diclorofenoxiacético), el 2,4,5-T (ácido 2,4,5-triclorofenoxiacético), Dicamba (ácido 2-methoxy-3,6-diclorobenzóico), MCPA (ácido 2 metil, 4-cloro fenoxiacético), NAA (ácido 1-naftalacético), NOA (2 ácido naftiloxiacético) y Picloram (ácido 4-amino-2,5,6-tricloropicolínico) (Slater *et al.*, 2003).

Las **Citoquininas** son un grupo de componentes relacionados estructuralmente, derivados de la purina, que presentan una cadena lateral de 5 carbonos en posición N⁶. Estos compuestos se han encontrado en todas las plantas, particularmente en los tejidos que se dividen de forma activa como meristemas, semillas en germinación, frutos en maduración y raíces en desarrollo. Sin embargo, al contrario que en las auxinas, fue la Kinetina (N⁶-furfurilaminopurina), de origen sintético, la primera citoquinina descubierta por Miller & Skoog en 1955, y denominada así por su capacidad para promover la citocinesis (división celular). Otras citoquininas sintéticas que suelen

emplearse en cultivo *in vitro* son el Thidiazuron o TDZ (1-phenyl-3-(1,2,3-thiadiazol-5-yl)urea) y la BAP (N⁶-benzilamino-purina) o BA (N⁶-benziladenina) (Slater *et al.*, 2003). Las citoquininas naturales más extendidas en las plantas superiores son la Zeatina (4-hidroxi-3-metil-trans-2-butenilaminopurina) y la 2iP (N⁶-2-isopentil adenina). Algunos de los efectos fisiológicos producidos por las citoquininas se resumen a continuación (Salisbury & Ros, 1992; Azcón-Bieto & Talón, 2001; Barceló-Coll *et al.*, 2001):

- Estimulan la división celular y la morfogénesis (iniciación de tallos/formación de yemas) en cultivo de tejidos no meristemáticos.
- Estimulan el desarrollo de las yemas laterales contrarrestando la dominancia apical impuesta por las auxinas.
- Estimulan la expansión foliar debido al alargamiento celular. Durante la germinación, las citoquininas promueven la elongación de las células de los cotiledones en respuesta a la luz.
- Retrasan la senescencia foliar al estimular la movilización de nutrientes y la síntesis de clorofila.
- Eliminan la dormancia que presentan las semillas de algunas especies.
- Influyen en la maduración de etioplastos en cloroplastos vía estimulación de la síntesis de clorofila.
- Estimulan la apertura estomática en algunas especies.

Otro tipo de compuestos relacionados estructuralmente son las denominadas **Giberelinas**, que se dan de forma natural en las plantas. Están involucradas en la regulación de la elongación celular y son importantes desde el punto de vista agrícola, ya que determinan la altura de las plantas (hiperelongación del tallo), la formación de los frutos y la germinación de las semillas. No hay muchas giberelinas que se usen en cultivo y la más empleada es el GA₃ (ácido giberélico) (Slater *et al.*, 2003).

El **Ácido abscísico** (ABA) es una hormona vegetal producida de forma natural, que inhibe la división celular, regula la germinación de las semillas e induce la abscisión (hoja, fruto). Regula además la apertura de los estomas y el control osmótico, y promueve la síntesis de proteínas almacenables. Se usa frecuentemente en cultivo *in vitro* para promover distintos tipos de desarrollo, como la inducción y maduración de embriones somáticos (Slater *et al.*, 2003).

El **Etileno** es un gas que se da de forma natural en las plantas. Es un regulador del crecimiento normalmente asociado a la maduración del fruto, y su uso en cultivo *in vitro* no está muy extendido. Es más, puede presentar un problema debido a que los cultivos producen etileno, y en ciertas cantidades puede inhibir el crecimiento y el desarrollo (Slater *et al.*, 2003).

Las **Poliaminas** son un grupo polivalente de compuestos que tienen dos o más grupos amina (-NH₂). La Putrescina (Put), Espermina (Spm) y Espermidina (Spd) son poliaminas que se sintetizan de forma natural, y derivan de los aminoácidos arginina y ornitina. Actúan a nivel de la membrana celular y tienen capacidad de inducir cambios en la síntesis macromolecular. Se relacionan también con la reproducción y desarrollo de órganos florales, y son estabilizadoras ante situaciones de estrés osmótico y abiótico. Se encuentran en todos los organismos, desde los microorganismos y algas, hasta los animales y plantas (Azcón-Bieto & Talón, 2001). En las fanerógamas marinas, concretamente en *Cymodocea nodosa*, Marián *et al.* (2000a) demostraron su presencia en todos los tejidos de la planta. Observaron una mayor acumulación en la sección apical del rizoma, lo que relacionaron con el hecho de ser una zona meristemática de crecimiento activo. Igualmente, diversos estudios con plantas superiores (Smith, 1985; Evans & Malmberg, 1989; Tiburcio *et al.*, 1993) y algas (Cohen *et al.*, 1983, 1984; Badini *et al.*, 1994; García-Jiménez *et al.*, 1998; Marián *et al.*, 2000b), han demostrado que las poliaminas tienen un efecto probado sobre la división celular.

Los **Brasinoesteroides** son un grupo de hormonas naturales, aisladas en 1979 a partir del polen de *Brassica napus*, que están presentes en ciertas especies vegetales. Además de promover la división y elongación celular, retardan la abscisión foliar, aumentan la resistencia a estreses y promueven la diferenciación del xilema (Creelman & Mollet, 1997).

El **Ácido salicílico** es una hormona vegetal de origen natural, importante para el crecimiento y desarrollo de las plantas, la fotosíntesis, la transpiración, la toma de iones y el transporte. Inducen, además, cambios específicos en la anatomía de las hojas y en la estructura de los cloroplastos. Una de las respuestas más importantes es la de aumentar la resistencia a determinados patógenos en plantas. Además, el ácido salicílico origina la producción de proteínas relacionadas con la patogénesis, las cuales aumentan la resistencia a las enfermedades en las hojas infectadas y de las adyacentes, y retarda la senescencia (Hayat & Ahmad, 2007).

Los **Jasmonatos** son hormonas vegetales naturales lipídicas, “derivados oxigenados de los ácidos grasos linoléico y linolénico, que actúan como moléculas señalizadoras de la respuesta de las plantas a numerosas situaciones de estrés y participan en diversos procesos de desarrollo de la planta” (Lorenzo-Sánchez, 2007). Regulan la formación de flores, frutos y semillas, inhiben el crecimiento de la raíz, y aumentan la resistencia a insectos y patógenos. Además, inhiben la germinación en semillas no durmientes y la estimulan en semillas durmientes (Creelman & Mollet, 1997). Las más conocidas son el ácido jasmónico (JA) y el metiljasmonato (MeJA).

Las **Oligosacarinas** son oligosacáridos solubles producidos por la degradación parcial de los polímeros constituyentes de la pared celular, y son capaces de regular el crecimiento y desarrollo vegetal a muy bajas concentraciones. En algunos estudios se ha demostrado que son antagonistas de las auxinas en el crecimiento y enraizamiento, y son capaces de inducir respuestas morfogénicas *in vitro* y de defensa frente a patógenos (Creelman & Mollet, 1997).

El **Óxido nítrico** (NO) es una sustancia natural producida en las plantas, que ejerce un control sobre su crecimiento y desarrollo, retarda la senescencia de los tejidos e induce respuestas de defensa. Es, además, un componente activo en los cambios fisiológicos que ocurren durante la germinación. El NO presenta un comportamiento dual, actuando como agente antioxidante u oxidante, dependiente del medio en el que se encuentre, lo que hace que se lo reconozca como un agente citoprotector y citotóxico al mismo tiempo (Beligni & Lamattina, 1999, 2000).

Varios autores han empleado sustancias reguladoras del crecimiento como estimuladoras del desarrollo de fanerógamas marinas en el laboratorio. El ácido giberélico fue la hormona que más eficazmente indujo el crecimiento de las hojas y las raíces en fragmentos de rizoma de *Cymodocea nodosa* (Terrados, 1995; García-Jiménez *et al.*, 2006). En otras ocasiones, y con diferentes especies de fanerógamas marinas, las hormonas que estimulaban el crecimiento de las plantas fueron las citoquininas (Bird *et al.*, 1996, 1998), las auxinas (Reed *et al.*, 1998; Balestri & Bertini, 2003; Balestri & Lardicci, 2006) o una combinación de auxinas y citoquininas (Loques *et al.*, 1990a; Bird & Jewett-Smith, 1994). **No hemos encontrado referencias de su uso sobre semillas o plántulas de *Cymodocea nodosa*, ni de su empleo en el desarrollo de sistemas de propagación a partir de las mismas.**

II.1.3. La supresión de la dominancia apical en las plántulas de *Cymodocea nodosa* puede resultar en el incremento de la biomasa foliar.

La dominancia apical fue definida por Cline (1994) como el control ejercido por el ápice sobre el crecimiento de las yemas laterales. La ruptura de la dormancia y el crecimiento inicial de las yemas responde a la eliminación de la dominancia apical (Cline & Harrington, 2007). En un sentido más amplio, la dominancia apical se refiere también al control sobre la orientación de las ramas laterales y las hojas, al igual que sobre el crecimiento de ramas, rizomas, estolones y tubérculos, y finalmente a la influencia sobre la abscisión de las hojas.

Según Cline (1997), la dominancia apical y su liberación (por decapitación del ápice), pueden dividirse en 4 fases de desarrollo, aunque esta teoría se aplica preferentemente en dicotiledóneas.

- Fase I. Formación de yemas laterales (promovida por citoquininas).
- Fase II. Imposición de la inhibición del crecimiento de yemas laterales, en ocasiones de forma permanente (represión por auxinas). A pesar de que la elongación de las yemas está inhibida, siguen siendo metabólicamente activas.
- Fase III. Salida de la dominancia apical durante las primeras horas tras la decapitación (disminuyen los niveles de auxinas y se liberan citoquininas). El inicio del crecimiento de las yemas laterales puede ser promovido por la aplicación directa de citoquininas e inhibido por la aplicación de auxinas sobre el tallo decapitado.
- Fase IV. Varios días después de la decapitación continúa el desarrollo de las yemas laterales que sintetizan sus propias auxinas y giberelinas, las cuales promueven la elongación y la formación de ramas.

Hay especies, como *Arabidopsis* o *Coleus*, en las que no se da la dominancia apical, y las yemas laterales continúan creciendo desde su formación hasta la fase IV sin la necesidad de decapitar la yema apical (Cline, 1996). Existen también especies donde se da una dominancia apical parcial, y presentan algunas yemas laterales que continúan creciendo sin necesidad de decapitación, por ejemplo *Phaseolus vulgaris* o *Petunia* sp.; y otras con dominancia apical completa, como *Helianthus*, *Tradescantia* o *Ipomea*, donde es necesaria la decapitación para el crecimiento de las yemas laterales (Cline, 1997).

Cline (1994) explica los mecanismos implicados en el control de la dominancia apical, y sugiere varias hipótesis. Una de las hipótesis es la inhibición por auxinas, donde las auxinas producidas en el ápice se mueven de forma basipetala a través del tallo hacia las yemas laterales e inhiben directamente su crecimiento. La mayor evidencia que demuestra esta hipótesis es que la salida de la dominancia apical tras la decapitación se ve inhibida o retardada si tratamos el ápice con auxinas (Cline, 1994; Cline & Harrington, 2007). Esto se ha demostrado en algunas especies como *Sargassum muticum* (Chamberlain *et al.*, 1979), *Pisum sativum* (Fišerová *et al.*, 2007) o *Ipomoea nil* (Cline & Sadeski, 2002). Otra evidencia de esta hipótesis es que si tratamos el tallo con un inhibidor del transporte de auxinas, normalmente comienza el crecimiento de las yemas laterales (Cline, 1994). La existencia de polaridad y dominancia apical se ha demostrado en varios experimentos con algas marinas. La eliminación del ápice en *Fucus vesiculosus*, *Ascophyllum nodosum*, *Petroglassum nicaeense*, *Caulerpa prolifera*, *Sargassum muticum* (Chamberlain *et al.*, 1979 y referencias que se citan en este artículo) o *Pterocladia capillacea* (Scrosati, 2002), resulta en el crecimiento de ramas o yemas subapicales. Los resultados sugieren que el control de la dominancia apical en las algas marinas está mediado en parte por las auxinas.

Existen por otro lado artículos donde la adición de citoquininas a las yemas inhibidas estimula su crecimiento. Según Cline (1994), parece probable que al disminuir los niveles de auxinas tras la decapitación se produce un aumento del nivel de citoquininas debido a la traslocación desde las raíces o por un aumento de la síntesis en la propia yema, lo que contrarresta los efectos represores de las auxinas (Cline & Harrington, 2007). Por ejemplo en *Pisum sativum* (Fišerová *et al.*, 2007), tras cortar el ápice del haz dominante, el haz inhibido sale de la dominancia apical incrementando el nivel de zeatina y la producción de etileno. En *Rosa hybrida* (Kapchina-Toteva *et al.*, 2002), la adición de 2 anticitoquininas reduce el número de yemas germinadas y la adición de BA contrarresta los efectos de esta inhibición.

El requerimiento de nutrientes es otra de las hipótesis para explicar la dominancia apical (Cline, 1994). La hipótesis consiste en que los nutrientes son la primera señal necesaria para la inducción de las yemas. También se ha observado que las citoquininas promueven la movilización de nutrientes lo que puede influenciar el crecimiento de las yemas (Cline, 1994).

Otra posible forma de explicar la dominancia apical es la inducción en el tallo, por parte de las auxinas, de inhibidores secundarios como ácido abscísico (ABA) o etileno, que se mueven hacia las yemas e inhiben directamente su crecimiento (Cline 1994; Cline & Harrington, 2007).

Actualmente, Cline & Harrington (2007) afirman que el gradiente de auxinas/citoquininas (en el cual las auxinas son originadas en el ápice y las citoquininas en las raíces) es el modelo más ampliamente aceptado para explicar el control hormonal sobre la dominancia apical. Sin embargo, otras señales como nutrientes y factores ambientales están también involucradas, y deben de ser tenidas en cuenta.

El crecimiento vegetativo de las fanerógamas marinas, al igual que en otras angiospermas clonales, es muy dependiente de la actividad de los meristemos apicales, que son los responsables de la dicotomía entre el crecimiento horizontal y vertical en estas especies (Terrados *et al.*, 1997). En las plantas clonales, al igual que ocurre en *Cymodocea nodosa*, la actividad de los meristemos está controlada por el proceso de dominancia apical, por el cual el crecimiento del meristemo apical tiene una influencia inhibitoria en el crecimiento de los meristemos laterales (Terrados *et al.*, 1997 y referencias que se citan en este artículo).

Terrados *et al.* (1997) comprobaron la dominancia apical de la especie *Cymodocea nodosa in situ*, eliminando el meristemo apical del rizoma horizontal. Brun *et al.* (2007) comprobaron que la arquitectura clonal de *Zostera noltii* parece estar regulada por la interacción de una fuerte dominancia apical y la distancia de integración clonal. En otras fanerógamas marinas, como *Amphibolis* y *Syringodium*, se ha observado que una afección en el ápice del rizoma principal provoca un incremento del número de ramas, pero los mecanismos de control no han sido comprobados experimentalmente (Terrados *et al.*, 1997 y referencias que se citan en este artículo).

En esta línea de exposición, el meristemo foliar del embrión de *Cymodocea nodosa* o SAM (*Shoot Apical Meristem*) es arrastrado por el crecimiento del cotiledón y no se desarrolla hasta que éste no alcanza un determinado tamaño, según vimos en el Capítulo I. Así pues, nos preguntamos si el crecimiento del cotiledón ejerce un efecto restrictivo sobre el desarrollo del SAM o de otras yemas laterales, o lo que es lo mismo, si la eliminación del ápice del cotiledón aceleraría el crecimiento del SAM o incrementaría el número de haces desarrollados.

II.1.4. *El tratamiento de las plántulas con fertilizantes puede mejorar su estatus nutritivo y aumentar la biomasa foliar y radicular con las que asegurar la supervivencia de las plántulas en el trasplante.*

Una de las prácticas agrícolas más extendidas ha sido y sigue siendo la utilización de fertilizantes para aumentar la producción vegetal. En este sentido, varios autores han estudiado cómo mejorar y acelerar el crecimiento de las fanerógamas marinas enriqueciendo con nutrientes el medio de cultivo o el sedimento donde crecen (Roberts *et al.*, 1984; Durako & Moffler, 1987; Short, 1987; Terrados & Ros, 1993; Agawin *et al.*, 1996; Woodhead & Bird, 1998; Kenworthy *et al.* 2000; Peralta *et al.*, 2003; Invers *et al.*, 2004; Ferdie & Fourqurean, 2004; Wilson & Bennett, 2008).

Los estudios sobre el crecimiento y el estado nutritivo de las praderas marinas *in situ* han documentado restricciones del crecimiento por limitación en el sedimento de nitrógeno (Short, 1987; Agawin *et al.*, 1996; Peralta *et al.*, 2003; Ferdie & Fourqurean, 2004) y fósforo (Pérez *et al.*, 1991; Terrados & Ros, 1993; Agawin *et al.*, 1996; Johnson *et al.*, 2006), lo que depende en último termino de la geoquímica propia del sedimento, del tamaño del grano, de la dinámica de disolución o de la saturación del lugar de adsorción (Short, 1987; Ferdie & Fourqurean, 2004).

Se ha comprobado que un aumento moderado en la disponibilidad de estos nutrientes estimula el crecimiento en fanerógamas marinas y su producción (Terrados & Ros, 1993 con *Cymodocea nodosa*; Fourqurean *et al.*, 1995, con *Halodule wrightii*; Agawin *et al.*, 1996, con las especies *Enhalus acoroides*, *Thalassia hemprichii* y *Cymodocea rotundata*; Ferdie & Fourqurean, 2004, con *Thalassia testudinum* y *Syringodium filiforme*). En otras ocasiones, la principal respuesta de las fanerógamas a la adición de nutrientes ha sido el aumento en su contenido de N y/o P total (Terrados & Ros, 1993, con *Cymodocea nodosa*; Erfteimeijer *et al.*, 1994, con *Thalassia hemprichii*; Agawin *et al.*, 1996, con *Enhalus acoroides*, *Thalassia hemprichii* y *Cymodocea rotundata*; Udy & Dennison, 1997, con *Zostera capricorni*; Invers *et al.*, 2004, con *Posidonia oceanica*; Heck *et al.*, 2006, con *Halodule wrightii*).

La fertilización de las praderas ha sido empleada en ocasiones para mejorar el crecimiento y la supervivencia de los trasplantes *in situ*. Kenworthy *et al.* (2000) emplearon un método alternativo para fertilizar las praderas dañadas de *Thalassia testudinum* y favorecer así el recubrimiento y la supervivencia de los trasplantes.

Observaron que la aplicación de fertilizantes y reguladores del crecimiento mediante inyección mecánica en sedimentos adyacentes a zonas dañadas no aumentaba significativamente la tasa de recubrimiento de *T. testudinum* y *Halodule wrightii*. Sin embargo, la defecación de pájaros produjo altas tasas de recubrimiento en trasplantes de *H. wrightii*, por lo que lo proponen como alternativa barata y efectiva para la restauración de praderas en sedimentos carbonatados poco profundos. Peralta *et al.* (2003) observaron que la fertilización del sedimento con nitrógeno y fósforo es altamente beneficioso para la restauración de *Zostera marina*, aunque se deben de tener en cuenta una serie de precauciones, como la adición suficiente de P para equilibrar el balance de enriquecimiento de N. Además, según diversos autores, la asimilación de N requiere de energía y carbono y, por lo tanto, un exceso de N disponible puede disminuir las reservas de carbohidratos necesarias para la supervivencia de las plantas en épocas de baja irradiancia (Peralta *et al.*, 2003; Invers *et al.*, 2004; Pérez *et al.*, 2007). La adición de carbono orgánico y nutrientes puede provocar, además, cambios sustanciales en las condiciones del sedimento, aumentando considerablemente la anoxia y los niveles de amonio y sulfuros tóxicos, lo que provoca en último término la muerte de las plantas (Pérez *et al.*, 2007). Según Agawin *et al.* (1996), la limitación por nutrientes y las respuestas a la fertilización son específicas de cada especie y varían en cada sitio, por lo que es importante que las necesidades nutritivas se estudien de manera particular y no extrapolar estudios de otras procedencias.

En condiciones controladas de laboratorio, Roberts *et al.* (1984) estudiaron el efecto del aumento de nutrientes (N, P, K) en el crecimiento de las plántulas de *Zostera marina*. En todos los casos la adición del fertilizante estimulaba el crecimiento de las plántulas, aumentando la longitud de las hojas y la producción de haces. Short (1987) llevó a cabo diversos experimentos con plántulas de *Z. marina* en mesocosmos, empleando dos tipos de substratos, uno rico en materia orgánica y otro pobre. Observó en todos los parámetros medidos, tanto biométricos como de composición de nutrientes, valores mayores en plántulas crecidas en substratos enriquecidos. Wilson & Bennett (2008) estudiaron los requerimientos de nutrientes *in vitro* de las especies *Halophila ovalis* y *Posidonia coriacea*. El número de hojas y raíces de *H. ovalis* aumentaba con los tratamientos de mayor concentración de nitrógeno. Sin embargo, la longitud de las raíces y el número de pelos radiculares era mayor cuando los cultivos no presentaban N. En *P. coriacea*, sin embargo, no se observaban cambios respecto al control con ningún tratamiento de adición de nutrientes. Según los autores, estas diferencias entre ambas

especies pueden ser debidas a las diferentes estrategias de crecimiento, ya que *Halophila* es una especie colonizadora y *Posidonia* se caracteriza por un crecimiento más lento. Woodhead & Bird (1998) desarrollaron un protocolo para acelerar la producción de las raíces de *Ruppia maritima* en cultivo, al mismo tiempo que aclimataban las plántulas a las condiciones *ex vitro*. Conforme aumentaba la concentración de nutrientes, la planta respondía aumentando el número de nodos y de raíces. Otros estudios de fertilización *in vitro* no muestran una asimilación positiva de los nutrientes, como es el caso de las plántulas de *Thalassia testudinum*, que tras el enriquecimiento del cultivo con nitrógeno no aumentaban el crecimiento respecto al control (Durako & Moffler, 1987).

En el caso particular de *Cymodocea nodosa*, cabe destacar el trabajo de nutrición *in situ* llevado a cabo por García Jiménez *et al.*, (2006), que ha permitido establecer específicamente los nutrientes necesarios para el crecimiento de *C. nodosa* en cultivo. Emplearon explantos tipo *ramets*, que contenía un internudo de rizoma, un haz y su respectiva raíz. Los *ramets* fueron sembrados en magentas con arena y agua de mar enriquecida con medio PES (PES, Provasoli, 1968) y suplementado con 3 formas de nitrógeno (Nitrato, glutámico y amonio) y 2 de fósforo (KH_2PO_4 y gliceraldehido 3 fosfato). Concluyeron que *C. nodosa* prefiere para su desarrollo una fuente de nitrógeno reducida (amonio) y otra de fósforo inorgánico (KH_2PO_4). Además comprobaron que i) el nitrógeno se asimila por las hojas y las raíces, ii) el fósforo preferiblemente por las raíces, y iii) el carbón asimilado por las hojas se trasloca rápidamente al rizoma y a las raíces. Estos resultados han servido de base para nuestros estudios de germinación, crecimiento y micropropagación de *C. nodosa*.

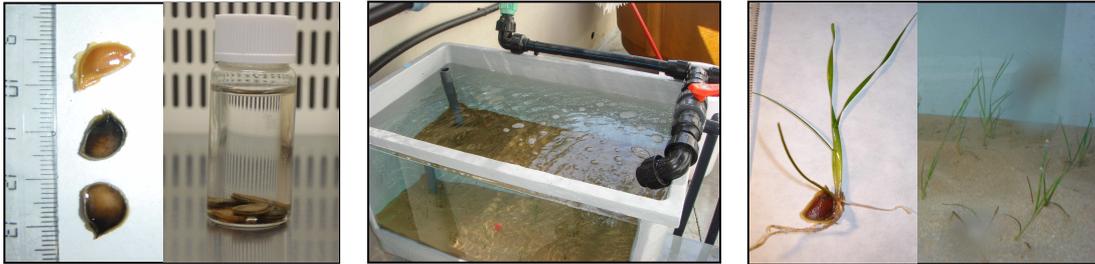
Por otra parte, la mayoría de los trabajos con *Cymodocea nodosa* se han centrado en realizar estudios de fertilización *in situ* y en determinar el contenido en nutrientes de la pradera natural (Pérez *et al.* 1991; Terrados & Ros 1993; Duarte & Sand-Jensen, 1996; Nielsen & Pedersen, 2000). Pérez *et al.* (1991) y Terrados & Ros (1993) observaron que el crecimiento de *C. nodosa* estaba limitado por la disponibilidad de fósforo en sedimentos carbonatados de la Bahía de Alfacos (Mar Mediterráneo) y del Mar Menor, respectivamente. En el estudio de Terrados & Ros (1993), la fertilización con N y P produjo un aumento del crecimiento y del contenido en ambos nutrientes de las hojas, raíces y rizomas, lo que sugiere por otra parte, que ambos elementos son necesarios para estimular el crecimiento. Sin embargo, Pérez *et al.* (1991) sólo

detectaron un aumento en el contenido de fósforo en las hojas y no de nitrógeno al realizar igualmente tratamientos de fertilización, detectando además una interacción negativa entre ambos elementos.

Otros estudios han demostrado la importancia del estatus nutritivo de las plántulas de *Cymodocea nodosa* para su establecimiento y para la formación de nuevos parches, y la importancia del crecimiento clonal para la traslocación de nutrientes y la supervivencia de la pradera (Duarte & Sand-Jensen, 1996; Nielsen & Pedersen, 2000). Duarte & Sand-Jensen (1996) observaron que las plántulas de *C. nodosa* de la Bahía de Alfacs eran extremadamente deficientes en P, aumentando la deficiencia con la edad de la plántula, lo que, según estos autores, puede ser la principal razón que impide a la mayoría de las plántulas (>90%) iniciar un nuevo parche, y no continuar su crecimiento vegetativo por más de tres años. Sin embargo, Nielsen & Pedersen (2000) concluyeron que las plántulas de *C. nodosa* de esa zona son el explanto que tiene el mayor contenido en nutrientes, al igual que una mayor fotosíntesis y tasa relativa de crecimiento, en relación a los demás tipos de explantos analizados. A pesar de la restricción en el desarrollo de las raíces de las plántulas, éstas son capaces de adquirir suficiente N y P del agua y del sedimento para sustentar mayores concentraciones de N y P que otro tipo de explantos (Nielsen & Pedersen, 2000). Según estos autores, la baja concentración de N y P en plántulas de *C. nodosa* encontrada por Duarte & Sand-Jensen (1996) puede ser debido a que ellos trabajaban con plántulas más viejas. Las observaciones de Nielsen & Pedersen (2000) soportan la hipótesis de la dispersión, tanto por semillas como por haces colonizadores, como medio para explotar nuevos recursos (en este caso del P), lo que contradice la hipótesis inicial planteada por Duarte & Sand-Jensen (1996), en la que asumen que la mayoría de las plántulas muere antes de iniciar un nuevo parche.

Los resultados obtenidos en los diferentes trabajos de nutrición con la especie *Cymodocea nodosa*, tanto la respuesta positiva en el crecimiento de la pradera al enriquecimiento del sedimento, como la importancia de mantener un elevado contenido en nutrientes para el establecimiento satisfactorio de las plántulas, nos hacen pensar en la necesidad de llevar a cabo experimentos de fertilización para mejorar tanto el estatus nutritivo, como el crecimiento y la supervivencia de las plántulas en el mar.

II.2. OBJETIVOS CAPÍTULO II



Una vez desarrollada la técnica de propagación vegetativa *in vitro* de semillas de *Cymodocea nodosa*, nos planteamos abordar estrategias para optimizar el procedimiento establecido, interviniendo sobre la conservación *in vitro* de las semillas y sobre la mejora, previo al trasplante, del estatus nutritivo y del crecimiento de las plántulas. Por ello centramos nuestro interés en tres puntos concretos:

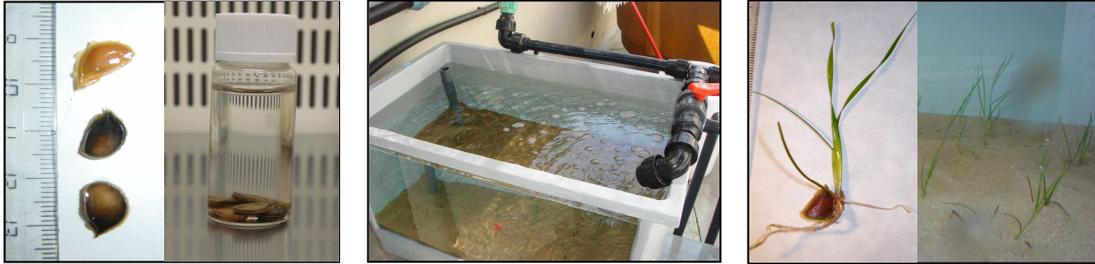
I) Establecimiento de las condiciones óptimas de almacenamiento de semillas de *Cymodocea nodosa* como medida para la conservación de germoplasma vegetal, ya que no se puede asegurar la viabilidad de las semillas y plántulas en el mar en todas las épocas del año, y, a decir de los antecedentes, tampoco se ha abordado la conservación *in vitro* de manera sistemática.

II) Estimulación del crecimiento y desarrollo de las plántulas de *Cymodocea nodosa* tratadas con reguladores del crecimiento. Trataremos las plántulas germinadas *in vitro* con reguladores de crecimiento para aumentar y acelerar el desarrollo foliar y radicular de cara a mejorar la supervivencia de los trasplantes. Determinaremos además el efecto de la dominancia apical en el desarrollo de las plántulas. En este caso, establecemos como hipótesis de partida que, tras cortar el ápice del cotiledón y tratar las plántulas con sustancias reguladoras del crecimiento, estimularemos el crecimiento y el desarrollo de nuevos haces a partir del meristemo foliar.

III) Optimización del crecimiento y desarrollo de las plántulas de *Cymodocea nodosa* tratadas con fertilizantes. Planteamos como hipótesis de partida la posibilidad de complementar el desarrollo de las plántulas en el periodo de aclimatación mediante tratamientos con fertilizantes de difusión lenta (N:P:K), previsiblemente útiles en el entorno marino y necesarios para favorecer el establecimiento de los trasplantes.

II.3. MATERIAL Y MÉTODOS

CAPÍTULO II



II.3.1. *Determinación de las condiciones óptimas de almacenamiento de las semillas de *Cymodocea nodosa*. Estudio del potencial germinativo anual en condiciones de almacenamiento y en semillas recolectadas de la naturaleza.*

a) Almacenamiento en seco y estudio del potencial germinativo anual.

La recolección de semillas ($n = 1080$, junio 2005) se llevó a cabo en una pradera situada al sureste de la isla de Gran Canaria (ver mapa muestreo de semillas Capítulo I, Fig. I.3A). Se esterilizaron según la metodología descrita en el material y métodos del Capítulo I, y se dejaron secar hasta alcanzar peso seco constante a temperatura ambiente sobre un papel de filtro, y posteriormente dentro de un desecador con gel de sílice. Cuando las semillas estuvieron secas se almacenaron de 10 en 10 en tubos de cristal herméticamente cerrados y etiquetados. Las semillas se almacenaron con una sustancia higroscópica (silicagel) y separadas por medio de un algodón para evitar la humidificación accidental de las muestras (Fig. II.1A-B). Los tubos de cristal se guardaron en condiciones de oscuridad, y a 3 temperaturas diferentes: -18°C , 4°C , y T^{a} ambiente ($20 \pm 2^{\circ}\text{C}$). Cada mes se extraían 30 semillas de cada tratamiento para estudiar su potencial germinativo. Las semillas se sembraban de 3 en 3 en recipientes tipo magenta, con arena y agua de mar diluida (18 psu) y enriquecida con medio de cultivo PES (ver metodología de siembra Capítulo I). Los cultivos se mantuvieron igualmente en una cámara de cultivo a $24 \pm 2^{\circ}\text{C}$, fotoperiodo 18:6 (luz:oscuridad) y $30 \mu\text{moles de fotones m}^{-2} \text{s}^{-1}$ a nivel de los recipientes de cultivo. Siguiendo el protocolo establecido para su propagación, la salinidad inicial se elevó a 36 psu a partir del segundo mes para acondicionar las plántulas a la salinidad propia del agua de mar.

b) Almacenamiento en agua de mar y estudio del potencial germinativo anual.

Para estudiar el almacenamiento de las semillas en agua de mar, se recogieron 1440 semillas de la pradera donante (noviembre 2005, 2006), que se limpiaron y se almacenaron de 10 en 10 en botes de cristal con agua de mar esterilizada, y en condiciones de oscuridad (Fig. II.1C). Se probaron tres temperaturas diferentes: 4°C , 18°C y T^{a} ambiente ($20 \pm 2^{\circ}\text{C}$). Cada mes se extraían 30 semillas de cada tratamiento para estudiar su potencial germinativo a lo largo de 1 año. El mes de noviembre fue considerado como el control, ya que las semillas fueron germinadas directamente, sin estar afectadas por el almacenamiento. Las condiciones de cultivo fueron similares a la

experiencia anterior: en recipientes tipo magenta con arena y agua de mar diluida (18 psu) y enriquecida con medio de cultivo PES, siguiendo la metodología de siembra descrita en el Capítulo I. Los cultivos se mantuvieron en una cámara de cultivo a $24 \pm 2^\circ\text{C}$, fotoperiodo 18:6 (luz:oscuridad) y $30 \mu\text{moles de fotones m}^{-2} \text{s}^{-1}$ a nivel de los recipientes de cultivo, incrementando la salinidad a 36 psu a partir del segundo mes.

c) Estudio del potencial germinativo anual de semillas recolectadas mensualmente de la naturaleza.

Se realizaron diferentes pruebas de germinación a lo largo del año, con el fin de determinar el estado de dormancia de las semillas en el mar y su capacidad germinativa en el laboratorio, y establecer así cuál es la mejor época para la recolección y puesta en cultivo de las semillas. Desde noviembre de 2006 hasta noviembre de 2007 se realizaron muestreos mensuales donde se recogieron 30 semillas cada vez, de la misma pradera situada en la costa sureste de Gran Canaria (ver Capítulo I, Fig. I.3A). Las semillas se limpiaron y se pusieron a germinar en recipientes de cultivo, de 3 en 3, y según las condiciones de siembra descritas en el Capítulo I. De esta forma estimamos el potencial germinativo propio de las semillas a lo largo del año, sin estar afectadas por las condiciones de almacenamiento.

II.3.2. Optimización del crecimiento y desarrollo de las plántulas de *Cymodocea nodosa* tratadas con reguladores del crecimiento.

Se recogieron 400 semillas (mayo 2007) y se dispusieron para su germinación en 100 recipientes tipo magenta (4 semillas en cada uno) según la metodología de siembra descrita anteriormente (arena y agua de mar enriquecida y diluida a 18 psu). A los 30 días tras la puesta en germinación de las semillas, se renovó el medio de cultivo, se aumentó la salinidad a 36 psu, y las plántulas germinadas se trataron con hormonas (t_0). Cada tratamiento con hormonas se basó en una inmersión o *dipping* de las plántulas durante 3 horas en tubos de ensayo con 50 ml de agua de mar esterilizada en autoclave y la correspondiente concentración de hormona determinada en cada tratamiento ($n = 20$). En dos tandas de experimentos se probaron 5 hormonas (NAA, IAA, 2,4-D, BAP, GA_3), con dos concentraciones diferentes (10^{-4} y 10^{-6} M). Se estableció el control para cada experiencia en medio con ausencia de reguladores. Los reguladores se prepararon

previamente en soluciones stock, disueltos según corresponde a su naturaleza y esterilizados por medio de filtros de 0.22 μM (Millipore) (ver Tabla II. 2).

A los 45 días se renovó el medio de cultivo realizándose un nuevo *dipping* (t_1), y a los 60 días (t_2) se dio por finalizado el experimento. Se tomaron medidas de las plantas en t_0 (día 30 desde la siembra) y t_2 (día 60) para poder calcular las tasas de crecimiento en este periodo (número de haces y de raíces, longitud de la hoja más larga desde su inserción con la semilla y longitud máxima de la raíz principal). Finalmente calculamos la tasa de crecimiento total, del día 30 (t_0) al día 60 (t_2), empleando para ello los índices descritos en el Capítulo I (ver material y métodos).

Tabla II.2. Hormonas empleadas en las diferentes experiencias de inducción de crecimiento en plántulas de *Cymodocea nodosa*, su disolución y preparación de soluciones stock.

	Peso molecular (uma)	Disolución acuosa (10ml)	Gramos	Concentración solución Stock	μl de solución stock al <i>dipping</i>	Concentración final <i>dipping</i> en agua de mar
IAA	175.2	NaOH (0.1N)	8.7×10^{-3}	5×10^{-3}	10	10^{-6}
			9.0×10^{-2}	5×10^{-2}	100	10^{-4}
NAA	186.2	Etanol (90%)	9.3×10^{-3}	5×10^{-3}	10	10^{-6}
			9.0×10^{-2}	5×10^{-2}	100	10^{-4}
2,4-D	221	Etanol (90%)	1.0×10^{-2}	5×10^{-3}	10	10^{-6}
			1.1×10^{-1}	5×10^{-2}	100	10^{-4}
BAP	225.2	HCl (1N)	1.0×10^{-2}	5×10^{-3}	10	10^{-6}
			1.1×10^{-1}	5×10^{-2}	100	10^{-4}
KIN	215.2	Etanol (90%)	1.0×10^{-2}	5×10^{-3}	10	10^{-6}
			1.0×10^{-1}	5×10^{-2}	100	10^{-4}
GA₃	346.4	Etanol (90%)	1.0×10^{-2}	5×10^{-3}	10	10^{-6}
			1.7×10^{-1}	5×10^{-2}	100	10^{-4}

Análisis estadístico y representaciones gráficas.

Se analizó la variabilidad ($p < 0.05$) de las tasas de crecimiento entre los diferentes tratamientos con reguladores de crecimiento mediante ANOVA de un factor y Post Hoc Tests (TukeyHSD y DunnettT3) en los casos en que los datos seguían distribuciones normales y varianzas homogéneas, y el test de Kruskal-Wallis y Mann-Whitney cuando no mostraban distribuciones normales. Se emplearon los programas SPSS®13.0 for Windows® (SPSS Inc. Chicago, Illinois, USA) para el análisis estadístico y el Sigmaplot 8.02 para la representación gráfica.

II.3.3. *Efecto de la dominancia apical en el crecimiento de las plántulas de Cymodocea nodosa.*

Se recolectaron 200 semillas (noviembre 2007; marzo 2008) y se pusieron a germinar según la metodología descrita en el Capítulo I. Veinte días después de la siembra (t_0), cuando las plántulas aún no habían emitido ni hojas ni raíces, se llevaron a cabo dos tandas de experimentos ($n = 20$), en los que se les cortó a las plántulas la punta del cotiledón (Fig. II.2) y se sumergieron durante 3 horas (*dipping*) en tubos de ensayo con agua de mar autoclavada y la concentración de hormona determinada en cada tratamiento: IAA (10^{-6} M), BAP (10^{-6} M), KIN (10^{-6} M) y GA₃ (10^{-4} M). Se estableció el control para cada experiencia en medio con ausencia de reguladores. Las hormonas se prepararon en soluciones stock, disueltas según corresponde a su naturaleza y esterilizados por medio de filtros de 0.22 μ M (Millipore) (ver Tabla II. 2).

A los 15 días se realizó el segundo *dipping* (día 35 tras la siembra, t_1) y 15 días después (día 50 tras la siembra, t_2) se dio por finalizado el tratamiento. En este momento se tomaron medidas de las plántulas (número de haces y de raíces, longitud de la hoja más larga y longitud máxima de la raíz principal), para calcular así las tasas de crecimiento entre el día 20 (t_0) y el día 50 (t_2), empleando para ello los índices descritos en el Capítulo I (ver Material y Métodos).

Análisis estadístico y representaciones gráficas.

Se analizó la variabilidad ($p < 0.05$) de las tasas de crecimiento entre los diferentes tratamientos con reguladores de crecimiento mediante ANOVA de un factor y Post Hoc Tests (TukeyHSD y DunnettT3) en los casos en que los datos seguían distribuciones normales y varianzas homogéneas, y el test de Kruskal-Wallis y Mann-Whitney cuando no mostraban distribuciones normales. Se emplearon los programas SPSS®13.0 for Windows® (SPSS Inc. Chicago, Illinois, USA) para el análisis estadístico y el Sigmaplot 8.02 para la representación gráfica.

II.3.4. Optimización del crecimiento y desarrollo de las plántulas de *Cymodocea nodosa* tratadas con fertilizantes de liberación lenta (N:P:K) y análisis del contenido en nutrientes del tejido vegetal y del sedimento.

Se recogieron semillas en agosto de 2007, que se esterilizaron y se germinaron según la metodología estandarizada. Mes y medio después de la siembra se llevaron 60 plántulas a los acuarios situados en las instalaciones del Instituto Canario de Ciencias Marinas. 30 plántulas se sembraron en un acuario sin fertilizantes (SF) y otras 30 en un acuario con fertilizantes (CF) (Fig. II.3). Los acuarios presentan unas dimensiones de 0.16 m^3 , con 15 cm de arena, flujo continuo de agua de mar y un promedio de luz incidente de $60 \mu\text{moles m}^{-2} \text{ s}^{-1}$. En el acuario CF se insertaron barras de nutrientes de difusión lenta N:P:K (composición según el fabricante en Tabla II.3) y se dispusieron a distancias de 5, 10 y 15 cm de las plantas, tal y como se representa en la Fig. II.4. En el acuario SF las plántulas se dispusieron de manera similar pero sin barras.

Tabla II.3. Composición de nutrientes de las barras fertilizantes N:P:K. (n.d. = no data)

Varitas fertilizantes COMPO	%	Gramos por varita (1 varita = 1 g)
Nitrógeno total (N)	12	0.12 g
Anhídrido Fosfórico (P_2O_5)	6	0.06 g
Oxido de Potasio (K_2O)	9	0.09 g
Microelementos	n.d.	n.d.

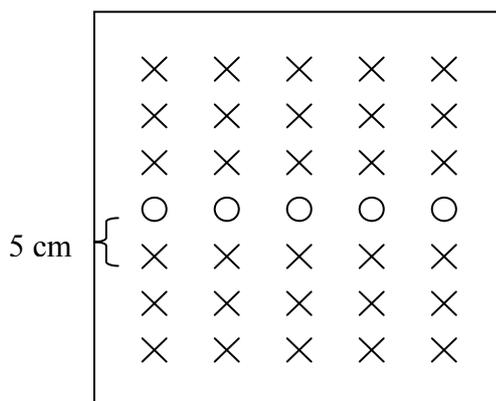


Fig. II.4. Representación del acuario CF y disposición de las barras y las plántulas (X = plántula; O = barra de fertilizantes N:P:K).

Las plántulas permanecieron en ambos acuarios (CF y SF) durante 30 días, y se tomaron medidas los días 0 y 30 (t_0 y t_{30}) del número de haces, de hojas y de raíces, y de la longitud de la hoja más larga desde su inserción con la semilla y de la longitud máxima de la raíz principal. Se hallaron las tasas de crecimiento en un intervalo de 30 días según se indica en las ecuaciones del Material y Métodos del Capítulo I.

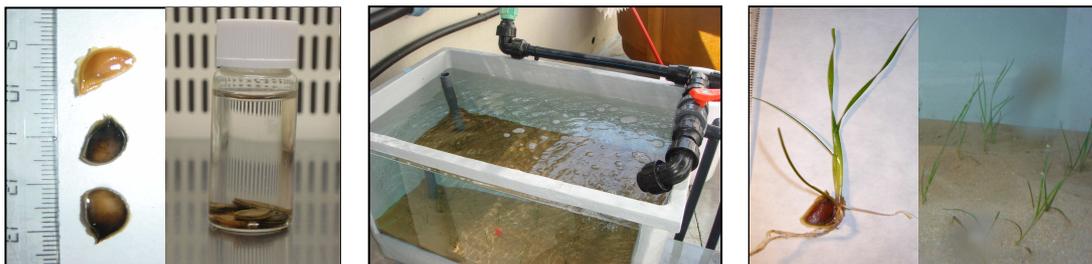
Para comprobar si las barritas de nutrientes N:P:K fertilizaron el sedimento se dispusieron igualmente en un acuario sin plantas y se recogieron muestras de agua intersticial (250 ml) con una jeringa, a una profundidad de unos 5 cm, los días 0, 10, 20 y 30, y a distancias de 10 y 15 cm de las barritas. Se analizó el contenido de Nitrógeno Kjeldahl y Fósforo Total mediante digestión espectrofotométrica de absorción molecular (Aguas de Telde, Gestión Integral del Servicio, S.A.).

Con el fin de determinar el contenido en nutrientes en plántulas no aclimatadas (t_0 = mes y medio después de la puesta en germinación; $n = 30$), y en plántulas aclimatadas con y sin fertilizantes durante 30 días (t_{30} CF y t_{30} SF, $n = 30$ en cada experiencia), se secaron hasta alcanzar peso seco constante (Estufa P-Selecta; 100°C) y se pesaron tras la eliminación del resto del contenido de la semilla, se trituraron y se pulverizaron con un molino de bolas (Molino mezclador MM 200 Retsch). El contenido se guardó en tubos eppendorf, que se etiquetaron y se enviaron al Servicio de ionómica CEBAS-CSIC para analizar el contenido en nutrientes mediante analizador elemental para el carbono y el nitrógeno, y análisis por ICP (*Inductively Coupled Plasma Analysis*) para el fósforo y el potasio.

Análisis estadístico y representaciones gráficas.

Se analizó la variabilidad ($p < 0.05$) de las tasas de crecimiento entre los tratamientos con y sin fertilizantes, y según la distancia a las barritas fertilizantes. Por otra parte se estudió la variabilidad del contenido en nutrientes y del peso seco de las plántulas no aclimatadas y de las aclimatadas con o sin fertilizantes, y dentro de las fertilizadas según su distancia a las barritas. Estas variables se analizaron mediante ANOVA de un factor y Post Hoc Tests (TukeyHSD y DunnettT3) en los casos en que los datos seguían distribuciones normales y varianzas homogéneas, y el test de Kruskal-Wallis y Mann-Whitney cuando no mostraban distribuciones normales. Se emplearon los programas SPSS®13.0 for Windows® (SPSS Inc. Chicago, Illinois, USA) para el análisis estadístico y el Sigmaplot 8.02 para la representación gráfica.

II.4. RESULTADOS CAPÍTULO II



II.4.1. Determinación de las condiciones óptimas de almacenamiento de las semillas de *Cymodocea nodosa*. Estudio del potencial germinativo anual en condiciones de almacenamiento y en semillas recolectadas de la naturaleza.

a) Almacenamiento en seco y estudio del potencial germinativo anual.

Tras la primera experiencia de almacenamiento en seco con tres temperaturas diferentes (-18°C, 4°C, y T^a ambiente) ninguna de las 1080 semillas germinó. Las semillas conservaban una apariencia aparentemente normal, sin cambios en la textura ni en la coloración, pero sin capacidad germinativa alguna.

b) Almacenamiento en agua de mar y estudio del potencial germinativo anual.

En la Fig. II.5A-B se muestra el porcentaje de germinación de las semillas de *Cymodocea nodosa* a lo largo de un año de almacenamiento en condiciones de temperatura controlada (18°C y 4°C), y a T^a ambiente (20 ± 2°C). Tras los primeros meses de almacenamiento, tanto con temperatura de 18°C como a T^a ambiente, se da un aumento de la germinación con respecto al mes de noviembre, considerado como control. Se alcanza el máximo de germinación en febrero y marzo para la T^a ambiente (86.7% en ambas experiencias) y en enero para la temperatura de 18°C (93.3%). Los elevados porcentajes de germinación que se dan entre los meses de noviembre y abril se corresponden con la Fase I, tal y como se muestra en la Fig. II.5. A partir de abril-mayo los porcentajes disminuyen para las dos temperaturas (Fase II), y las semillas pierden potencial germinativo. Finalmente se mantuvieron unos porcentajes de germinación del 43.3% en semillas conservadas a T^a ambiente doce meses después del almacenamiento (Fig. II.5A), y del 60% a 18°C (Fig. II.5B). El almacenamiento a 4°C sólo mantuvo la capacidad germinativa de las semillas en el primer mes, disminuyendo un 10% respecto al mes control (noviembre, 67%). Los porcentajes siguieron disminuyendo a partir del segundo mes (20%) para alcanzar un 0% en el quinto (Fig. II.5B).

c) Estudio del potencial germinativo anual de semillas recolectadas de la naturaleza.

En la Fig. II.6 observamos la germinación de las semillas a lo largo de un año sin estar afectadas por las condiciones de almacenamiento. En esta ocasión el porcentaje de germinación inicial en noviembre es de un 56.6%, incrementándose entre los meses

de diciembre (86.6%) y abril (80%) (Fase I); la máxima germinación se da en el mes de marzo con un 90%. La germinación disminuye ligeramente entre los meses de mayo y julio, donde los porcentajes pasan de un 66.6% en mayo a un 46.6% en julio (Fase II). A partir de agosto, se observa una tendencia al alza, llegando a recuperar en el mes de noviembre un 76.6% de germinaciones (Fase III).

II.4.2. Optimización del crecimiento y desarrollo de las plántulas de *Cymodocea nodosa* tratadas con reguladores del crecimiento.

En la Fig. II.7 se representan las tasas de crecimiento entre los días 30 (t_0) y 60 (t_2), obtenidas en dos tandas de experimentos, y tras 2 inmersiones en presencia de hormonas.

En la tasa de crecimiento foliar (Fig. II.7A1-A2) se observa un efecto significativamente positivo de la hormona GA_3 (10^{-4} M), y del 2,4-D (10^{-6} M) en menor medida ($p < 0.05$). El resto de hormonas empleadas no muestran diferencias significativas entre ellas ni respecto al control.

Por otra parte, la tasa de emisión de haces foliares (Fig. II.7B1-B2) disminuye significativamente tras la inmersión en GA_3 (10^{-4} M) y en BAP (10^{-4} M), mostrando efectos inhibitorios respecto al control y a otras hormonas ($p < 0.05$). El resto de hormonas empleadas no muestran efectos estimulatorios en la emisión de haces pero tampoco inhibitorios.

En el caso del crecimiento de las raíces (Fig. II.7C1-C2), se observa un efecto inhibitorio de la auxina NAA (10^{-4} M) y principalmente del IAA (10^{-4} M). El resto de hormonas carecen de un efecto estimulatorio del crecimiento radicular, y no muestran diferencias significativas respecto al control.

La tasa de emisión de raíces también se ve inhibida por ciertas hormonas, como el IAA (10^{-4} y 10^{-6} M), el GA_3 (10^{-6} M) y el 2,4-D (10^{-6} M) ($p < 0.05$) (Fig. II.7D1-D2).

En ningún caso, tanto en los tratamientos que fueron estimulantes del crecimiento como en los inhibitorios, se pudo apreciar un desarrollo vegetativo con un patrón diferente al del ensayo control.

II.4.3. Efecto de la dominancia apical en el crecimiento de las plántulas de *Cymodocea nodosa*.

En la Fig. II.8 se representan las tasas de crecimiento entre el día 20 (t_0) y 50 (t_2) de las plántulas sin el ápice del cotiledón, tras dos inmersiones en presencia de hormonas, y obtenidas en dos tandas de experimentos. En ninguna de las distintas experiencias se observan diferencias significativas respecto al control ni entre las distintas hormonas empleadas, tanto con el empleo de auxinas (IAA), como de citoquininas (BAP, KIN) o giberelinas (GA_3). No se observa ningún efecto estimulador ni inhibitorio en el crecimiento de las plántulas decapitadas. En ningún caso se apreció un desarrollo vegetativo con un patrón diferente al del ensayo control.

II.4.4. Optimización del crecimiento y desarrollo de las plántulas de *Cymodocea nodosa* tratadas con fertilizantes de liberación lenta (N:P:K) y análisis del contenido en nutrientes del tejido vegetal y del sedimento.

En la Fig. II.9 se representan las tasas de crecimiento foliar y radicular y las tasas de emisión de raíces, hojas y haces foliares de las plántulas aclimatadas durante 30 días en acuarios con o sin fertilizantes, sin tener en cuenta la distancia a las barritas fertilizantes. Se observan diferencias significativas únicamente en la tasa de emisión de raíces ($p < 0.05$), siendo superior el número de raíces emitidas en las plántulas aclimatadas con fertilizantes. En la Fig. II.10 se muestran los acuarios y las plántulas aclimatadas durante 30 días con o sin fertilizantes. Las fotos fueron tomadas 8 días después del inicio del periodo de aclimatación.

Teniendo en cuenta la distancia a las barritas fertilizantes, en la Fig. II.11 se representan las tasas de crecimiento foliar y radicular y las tasas de emisión de raíces, hojas y haces foliares de las plántulas aclimatadas durante 30 días con fertilizantes. No se observan diferencias significativas en ninguna de las tasas de crecimiento, aunque sí una tendencia de crecimiento mayor en las plántulas situadas a 10 cm de las barritas.

En la Fig. II.12 se representa la concentración de nitrógeno y fósforo ($mg\ l^{-1}$) en el sedimento, a lo largo de los 30 días de estudio y a distancias de 10 y 15 cm de las barritas de nutrientes. Los valores de estos nutrientes en el sedimento antes de la fertilización son menores a $1\ mg\ l^{-1}$. Los niveles de fósforo a 10 y 15 cm de las barritas se mantuvieron constantes a lo largo de todo el periodo de fertilización, no variando

respecto al control (t_0). Únicamente a 10 cm y tras diez días de fertilización (t_{10}), los niveles de fósforo alcanzaron 1.5 mg l^{-1} . Por el contrario, los niveles de nitrógeno se incrementaron con respecto al tiempo inicial hasta 3 veces (3.6 mg l^{-1} de nitrógeno a 10 cm en t_{10}), y manteniéndose relativamente constantes a 10 cm hasta el día 30 (t_{30}). El nitrógeno, a 15 cm de la barrita, disminuye a partir del día 20, volviendo a los valores iniciales.

Respecto al contenido en nutrientes y al peso seco de las plántulas aclimatadas durante 30 días con o sin fertilizantes (sin tener en cuenta la distancia a las barritas) y de las plántulas no aclimatadas, se muestran los miligramos de peso seco en la Tabla II.4, los porcentajes de P, N, C y K, y las ratios de N/P, C/P y C/N (media \pm ee).

Tabla II.4. Mg de peso seco; % de P, N, C y K (media \pm ee); ratios N/P, C/P y C/N (media \pm ee) de las plántulas el día 0 y tras 30 días de aclimatación con o sin fertilizantes (sin tener en cuenta la distancia a las barritas). Diferente letra entre paréntesis hace referencia a diferencias significativas ($p < 0.05$). Entre paréntesis el número de muestras analizadas en cada experimento.

	día 0	día 30 SF	día 30 CF
mg peso seco (n = 30, 25, 26)	$21.37 \pm 1.26^{(a)}$	$33.27 \pm 2.01^{(b)}$	$49.32 \pm 3.57^{(c)}$
P total (%) (n = 3, 6, 6)	$0.53 \pm 0.013^{(a)}$	$0.36 \pm 0.019^{(b)}$	$0.28 \pm 0.004^{(c)}$
N total (%) (n = 6, 12, 12)	$4.27 \pm 0.137^{(a)}$	$2.78 \pm 0.101^{(b)}$	$1.83 \pm 0.044^{(c)}$
C total (%) (n = 6, 12, 12)	$35.06 \pm 0.28^{(a)}$	$34.50 \pm 0.31^{(a)}$	$34.09 \pm 0.33^{(a)}$
K % (n = 3, 6, 6)	$3.30 \pm 0.14^{(a)}$	$3.64 \pm 0.09^{(a)}$	$4.40 \pm 0.08^{(b)}$
N/P (n = 3, 6, 6)	$7.98 \pm 0.19^{(a)}$	$7.80 \pm 0.24^{(a)}$	$6.43 \pm 0.19^{(b)}$
C/P (n = 3, 6, 6)	$65.47 \pm 1.71^{(a)}$	$97.72 \pm 4.84^{(b)}$	$119.99 \pm 2.35^{(c)}$
C/N (n = 6, 12, 12)	$8.23 \pm 0.26^{(a)}$	$12.57 \pm 0.39^{(b)}$	$18.74 \pm 0.47^{(c)}$

El peso seco de las plántulas es significativamente diferente en los tres experimentos ($p < 0.05$). Las plántulas aclimatadas con fertilizantes presentan una mayor biomasa vegetal (49.32 mg), correspondiente con un mayor crecimiento, en relación a las aclimatadas sin fertilizantes (33.27 mg) y a las no aclimatadas (21.37 mg). Sin embargo, a pesar de la fertilización, los contenidos de nitrógeno (1.83%) y fósforo (0.28%) son significativamente menores al de las plántulas no fertilizadas (2.78% N y 0.36% P), y el de éstas es significativamente menor al de las plántulas no aclimatadas

(4.27% N y 0.53% P). Estas diferencias en el contenido de nitrógeno y fósforo se reflejan a su vez en las ratios C/P y C/N, ya que el carbono es un elemento que se mantiene relativamente estable en todos los experimentos. Por otra parte, se observa un incremento significativo del K en las plántulas fertilizadas (4.40%) respecto al resto de tratamientos (3.64% en las no fertilizadas y 3.30% en las no aclimatadas).

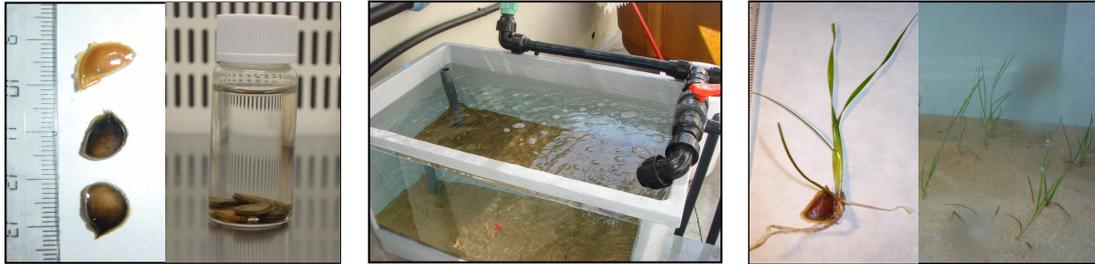
En la Tabla II.5 se muestran los resultados de peso seco en miligramos, los porcentajes de P, N, C y K (media \pm ee), y las ratios N/P, C/P y C/N (media \pm ee) de las plántulas aclimatadas durante 30 días en acuarios con fertilizantes teniendo en cuenta la distancia a las barritas fertilizantes (5, 10 y 15 cm).

Tabla II.5. Mg de peso seco; % de P, N, C y K (media \pm ee); ratios N/P, C/P y C/N (media \pm ee) de las plántulas aclimatadas en acuarios durante 30 días y a una distancia de 5, 10 y 15 cm de las barritas. Diferente letra entre paréntesis hace referencia a diferencias significativas ($p < 0.05$). Entre paréntesis el número de muestras analizadas en cada experimento.

	distancia 5 cm	distancia 10 cm	distancia 15 cm
mg peso seco (n = 10, 8, 8)	50.56 \pm 6.733 ^(a)	52.76 \pm 5.670 ^(a)	44.32 \pm 6.161 ^(a)
P total (%) (n = 2, 2, 2)	0.282 \pm 0.014 ^(a)	0.283 \pm 0.006 ^(a)	0.288 \pm 0.001 ^(a)
N total (%) (n = 4, 4, 4)	1.80 \pm 0.05 ^(a)	1.88 \pm 0.06 ^(a)	1.80 \pm 0.11 ^(a)
C total (%) (n = 4, 4, 4)	34.16 \pm 0.57 ^(a)	34.10 \pm 0.71 ^(a)	34.00 \pm 0.62 ^(a)
K % (n = 2, 2, 2)	4.38 \pm 0.08 ^(a)	4.37 \pm 0.28 ^(a)	4.46 \pm 0.03 ^(a)
N/P (n = 2, 2, 2)	6.41 \pm 0.26 ^(a)	6.65 \pm 0.06 ^(a)	6.24 \pm 0.62 ^(a)
C/P (n = 2, 2, 2)	121.57 \pm 8.34 ^(a)	120.35 \pm 1.00 ^(a)	118.05 \pm 2.55 ^(a)
C/N (n = 4, 4, 4)	18.98 \pm 0.71 ^(a)	18.17 \pm 0.86 ^(a)	19.07 \pm 1.00 ^(a)

En el caso del peso seco de las plántulas fertilizadas a diferentes distancias de las barritas no se observan diferencias significativas. Sin embargo, a pesar de que estadísticamente no hay diferencias, se puede observar cómo las plántulas sembradas a 15 cm de la barrita presentan una biomasa relativamente inferior (44.32 mg) en relación a las sembradas a 5 y 10 cm (50.56 y 52.76 mg respectivamente). Por otra parte, los valores de N, P, C y K se mantienen relativamente constantes a las 3 distancias establecidas, no mostrando diferencias significativas en ningún caso, al igual que ocurre con las diferentes ratios de N/P, C/P y C/N.

II.5. DISCUSIÓN CAPÍTULO II



II.5.1. *Cymodocea nodosa* produce semillas recalcitrantes que no toleran la desecación y sufren graves daños como consecuencia de la salida de agua de las células.

Los datos obtenidos del Capítulo I adelantaban que nos encontramos ante un tipo de semillas recalcitrantes debido al elevado contenido en humedad que presentan. Efectivamente, tras la primera experiencia de almacenamiento de semillas en seco en la que ninguna semilla germinó, podemos definir las semillas de *Cymodocea nodosa* como recalcitrantes de acuerdo a la clasificación de diferentes autores (Pammenter & Berjak, 1999, 2000; Walters, 2000; Piriz-Carrillo *et al.*, 2004). Según Pammenter & Berjak (2000), las semillas recalcitrantes pueden sufrir tres tipos de daños al ser sometidas a un proceso de desecación, que dependen del metabolismo de la propia semilla y de la velocidad con que se retira el agua:

1º) Daños mecánicos asociados a la reducción del volumen celular, lo que debe ocurrir únicamente en semillas con células muy vacuolizadas, como *Avicennia marina* (Acanthaceae) (Pammenter & Berjak, 2000).

2º) Daños por degradación oxidativa, como consecuencia de un metabolismo no regulado. En condiciones lentas de deshidratación, es este tipo de daños el que más afecta a las semillas recalcitrantes. Los mecanismos que desarrollan las semillas ortodoxas para protegerse de los radicales libres y que no se presentan en semillas recalcitrantes son, entre otros, la desactivación metabólica, la desdiferenciación de orgánulos y la presencia de sistemas antioxidantes efectivos.

3º) Daños biofísicos en macromoléculas como consecuencia de retirar el agua muy rápidamente. Los mecanismos de protección que desarrollan las semillas ortodoxas incluyen a las proteínas LEA (*Late Embryogenesis Abundant*), la vitrificación por azúcares, y las moléculas anfipáticas que migran entre el citosol y las membranas durante la deshidratación y rehidratación. Estudios más recientes evidencian la presencia, en semillas ortodoxas, de moléculas que estabilizan las proteínas de membrana conforme sale el agua de las células.

Existen muchas especies de interés comercial, agroalimentario o forestal, tanto de origen templado como tropical, que producen semillas recalcitrantes, como *Quercus*, *Shorea*, *Castanea* spp., *Hevea brasiliensis*, *Theobroma cacao*, *Bactris gasipaes*, *Araucaria angustifolia*, *Persea americana*, *Mangifera* sp. o *Laurus nobilis*, entre

muchas otras (Villalobos *et al.*, 1992; Piriz-Carrillo *et al.*, 2004; Konstantinidou *et al.*, 2008; Berjak & Pammenter, 2008).

En fanerógamas marinas apenas existen citas específicas sobre la tolerancia o intolerancia de las semillas a la deshidratación, aunque la mayor parte de los autores mencionan su almacenamiento en agua de mar (Tabla II.1). McMillan (1983b) observó que las semillas de *Zostera marina* que se encuentran secas en la orilla no germinan, lo cual indica que la desecación puede ser letal para esta especie. Hootsmans *et al.* (1987) mencionan igualmente que la desecación de las semillas y las condiciones anaeróbicas son letales para *Z. marina* (se reduce la germinación por debajo del 10%, y ninguna semilla se desarrolla hasta plántula), a pesar de que la desecación ocurre naturalmente cuando las semillas llegan a la orilla. Por otro lado, según Koch & Seelinger (1988), las semillas de *Ruppia maritima* presentan mayores porcentajes de germinación tras ser secadas previamente, lo que puede ser considerado como un mecanismo adaptativo al periodo de sequía que sufre el hábitat del cual proceden (saladares y marismas).

II.5.2. Las semillas recalcitrantes deben ser almacenadas bajo condiciones específicas de humedad y temperatura para mantener potenciales germinativos elevados durante periodos prolongados.

Según Berjak & Pammenter (2008), la única manera de conservar semillas recalcitrantes es almacenarlas a la mínima temperatura que les permita mantener su viabilidad, en condiciones de humedad elevadas para evitar la pérdida de agua, y eliminar previamente la flora bacteriana y fúngica asociada a la semilla ya que pueden afectar irremediablemente a la calidad de las semillas. Se asume, además, que las semillas recalcitrantes presentan periodos de vida cortos, de días a meses en especies tropicales, llegando a alcanzar en algunas especies de climas templados periodos de vida más largos (entre 1 y 2 años) (Berjak & Pammenter, 2008). Aun así, existen antecedentes de conservación prolongada en semillas recalcitrantes procedentes de zonas tropicales como *Araucaria angustifolia* (Piriz-Carrillo *et al.*, 2004), que fue conservada durante 24 meses a 4 y 0°C con películas plásticas flexibles de etil vinil acetato y polietileno, manteniendo altos porcentajes de germinación final. Las semillas de pejibaye (*Bactris gasipaes*) almacenadas con altos contenidos en humedad (30 y 40%) y 25°C de temperatura, conservan altos porcentajes de germinación durante 9-12 meses (Villalobos *et al.*, 1992). Más limitado ha sido el almacenamiento, por ejemplo,

de las semillas recalcitrantes de laurel (*Laurus nobilis*), que se mantuvieron viables durante 4 meses en condiciones de frío ($0 \pm 1^\circ\text{C}$), sin haber sido secadas previamente (Konstantinidou *et al.*, 2008).

La criopreservación de las semillas a temperaturas de -80°C o en nitrógeno líquido (-196°C), parece, según Berjak & Pammenter (2008), la única posibilidad de almacenar ciertas semillas recalcitrantes por periodos prolongados. Existen tres procedimientos para llevar a cabo la criopreservación de semillas, embriones, esporas, células en suspensión o meristemas apicales, que han sido empleados con éxito en diferentes especies (Krishnapillay, 2000):

1) La técnica más sencilla consiste en la desecación del material vegetal, congelándolo rápidamente mediante inmersión directa en nitrógeno líquido. La criopreservación de semillas recalcitrantes empleando esta técnica se ha conseguido en algunas semillas no ortodoxas que pueden soportar tasas rápidas de deshidratación como *Azadirachta indica*, *Warburgia salutaris* y *Wasabia japonica* (ver referencias internas en Berjak & Pammenter, 2008).

2) La segunda técnica empleada es la vitrificación, que consiste en el tratamiento de las muestras con soluciones crioprotectoras muy concentradas y su congelación ultrarrápida, para evitar la formación de cristales de hielo inter e intracelulares. Esta técnica se ha utilizado con éxito para la criopreservación de diferentes especies como *Colocasia esculenta*, *Prunus domestica*, *Bletilla striata* o *Musa* spp. (Takagi *et al.*, 1997; Thinh, 1999; De Carlo *et al.*, 2000; Hirano *et al.*, 2005; Panis *et al.*, 2005).

3) Finalmente, la criopreservación puede llevarse a cabo mediante la encapsulación en alginato de los embriones precultivados en medio líquido con alta concentración de sacarosa (Krishnapillay, 2000). Posteriormente se deshidratan parcialmente y se procede a la congelación mediante inmersión directa en nitrógeno líquido o mediante la utilización de programadores electrónicos de descenso de temperatura ($1^\circ\text{C}/\text{min}$). Esta técnica se ha empleado en especies como *Oncidium bifolium* (Flachsland, 2002; 2006) o *Vanda coerulea* (Jitsopakul *et al.*, 2008).

La criopreservación, como técnica de conservación de semillas recalcitrantes, no ha sido estudiada en este trabajo. Sin embargo, tal y como se ha mencionado previamente, el almacenamiento prologado de semillas puede contribuir a optimizar los métodos de propagación que hemos desarrollado, por lo que la vía de la criopreservación debe ser explorada en posteriores ensayos.

La necesidad de almacenar las semillas recalcitrantes en condiciones de humedad elevada no se diferencia de las condiciones descritas para las fanerógamas marinas. Así, Churchill (1983) halló una elevada supervivencia en semillas de *Zostera marina* (22 meses) almacenadas en sedimento con agua de mar (30 psu) a temperatura ambiente. McMillan (1991) recolectó semillas de varias especies y las mantuvo vivas durante largos periodos de tiempo bajo condiciones de laboratorio. Almacenó las semillas de *Syringodium* y *Halodule* con agua de mar artificial, luz y 24-27°C. Las semillas de *S. filiforme* continuaban germinando 4 años y un mes después de la recolección. Igualmente las semillas de *H. wrightii* y *H. uninervis* germinaron durante más de 3 años. Almacenó también semillas de *Halophila engelmannii* que germinaban tras dos años de almacenamiento en oscuridad a 24-27°C con agua de mar artificial. Posteriormente, Conacher *et al.* (1994) consiguieron mantener viables semillas de *Zostera capricorni* durante un periodo de 50 días, almacenadas en agua de mar aireada y baja temperatura (5-10°C). Las semillas almacenadas a 22-24°C no eran viables tras 50 días de almacenamiento. Reed *et al.* (1998) almacenaron semillas de *Phyllospadix torreyi* bajo condiciones de frío y oscuridad, consiguiendo retrasar la germinación más de 83 días sin afectar el porcentaje final de germinación. Granger *et al.* (2002) mantuvieron viables las semillas de *Zostera marina* durante meses en tanques con flujo continuo de agua de mar a temperatura ambiente. Ailstock & Shafer (2006) redactaron un protocolo para la recolección de semillas a gran escala, su procesado y almacenamiento, en dos especies de plantas acuáticas: *Ruppia maritima* y *Potamogeton perfoliatus*. Estudiaron las condiciones necesarias para almacenar estas semillas durante periodos prolongados, probando para ello dos temperaturas (4°C y 21°C), tres salinidades (0, 10 y 15 psu), y oxígeno (aireación, no aireación) durante 9 meses. Los resultados de este experimento indicaron que las semillas de *P. perfoliatus* deben de ser almacenadas en condiciones de frío para permanecer viables y ser capaces de germinar cuando son transferidas a temperaturas de inducción. La aireación y altas concentraciones de salinidad fueron también factores importantes durante el almacenamiento. El 85% de las semillas germinaban al transferirlas de 15 psu a 0 psu. En la especie *Ruppia maritima*, las condiciones de frío mejoraban la germinación pero también inducían una germinación prematura durante el almacenamiento, lo que reducía la efectividad de las semillas para proyectos de restauración. El porcentaje de germinación más elevado lo obtuvieron almacenando semillas a 21°C y 15 psu, transfiriéndolas posteriormente a agua dulce. Otras experiencias menos satisfactorias

fueron llevadas a cabo por Belzunce *et al.* (2008), que intentaron mantener semillas de *Posidonia oceanica* en agua de mar y bajas temperaturas (5°C), pero tras 11 y 17 días de almacenamiento las semillas perdieron mucha viabilidad respecto a las no almacenadas (test de tetrazolium) y ninguna semilla fue capaz desarrollarse normalmente.

En el caso del almacenamiento de semillas de *Cymodocea nodosa*, Buia & Mazzella (1991) recogieron semillas en enero y las mantuvieron en el laboratorio hasta que empezaron a germinar en junio, pero no especificaron las condiciones de almacenamiento. Pirc *et al.* (1986) recogieron semillas en septiembre y noviembre y las colocaron en recipientes dentro de tanques de cultivo con diferentes sustratos, flujo continuo de agua de mar o agua de mar artificial aireada, y temperatura ambiente o temperaturas constantes de 15 y 20°C. Las semillas permanecieron en estas condiciones hasta que germinaban en abril-mayo, lo que indica, por otro lado, la existencia de un periodo de dormancia, como detallaremos más adelante. Observaron, además, que la disminución de la temperatura durante el periodo de dormancia disminuyó la germinación en relación a la temperatura ambiente.

En este trabajo hemos almacenado semillas esterilizadas de *Cymodocea nodosa*, en agua de mar estéril a 4°C, 18°C y temperatura ambiente (20 ± 2°C). Los máximos porcentajes de germinación, superando incluso los obtenidos en el mes control, se obtuvieron tras 2 y 3 meses de almacenamiento a temperatura ambiente (86.7% en febrero y marzo) y a 18°C (93.3% en enero). Las semillas conservaron potenciales germinativos relativamente elevados al final del periodo de almacenamiento: 43.3% a temperatura ambiente 12 meses después del almacenamiento y 60% a 18°C tras 11 meses de almacenamiento (Fig. II.5A-B). Según Berjak & Pammenter (2008), el almacenamiento en las semillas recalcitrantes está restringido debido a que presentan un metabolismo activo y continúan desarrollándose hasta que la germinación ocurre. Esto sucede en las semillas de *Cymodocea nodosa*, que, tal y como vimos en el Capítulo I, se encuentran en el nivel III o IV de hidratación antes de la imbibición, el cual debe mantenerse durante todo el almacenamiento. Por lo tanto, creemos que la disminución del potencial germinativo tras 12 meses de almacenamiento puede ser debido a que el embrión de *C. nodosa* se degrada de forma natural a causa de su metabolismo activo, o debido a la proliferación de hongos y bacterias como consecuencia de las condiciones de almacenamiento en agua y temperatura elevada.

Por otra parte, si bien las bajas temperaturas suelen prolongar la vida de las semillas durante el almacenamiento debido a que reducen su metabolismo e inhiben el desarrollo de hongos y bacterias, hay muchas semillas recalcitrantes que no sobreviven en estas condiciones, tales son los casos de *Theobroma cacao*, *Trichilia emetica*, *Telfairia occidentalis* o *Avicenia marina* (Berjak & Pammenter, 2008 y referencias internas). Así, las semillas de pejibaye (*Bactris gasipaes*) conservadas a 5 y 15°C germinaron escasamente (Villalobos *et al.*, 1992). Sin embargo, otras especies como *Laurus nobilis* y *Araucaria angustifolia* mantienen su potencial germinativo almacenadas a bajas temperaturas ($0 \pm 1^\circ\text{C}$ en *Laurus nobilis*, y $4-0^\circ\text{C}$ en *Araucaria angustifolia*) (Konstantinidou *et al.*, 2008; Piriz-Carrillo *et al.*, 2004).

En el caso de las semillas recalcitrantes de *Cymodocea nodosa*, el almacenamiento a bajas temperaturas afecta a su viabilidad, ya que, almacenadas en agua de mar a 4°C, sólo mantuvieron su potencial germinativo durante los primeros meses de almacenamiento (Fig. II.5B). Desde el segundo mes de almacenamiento a 4°C disminuyen drásticamente su potencial germinativo, pasando de un 20% en enero hasta llegar a 0 en el quinto mes (abril).

Por lo tanto podemos afirmar que **las semillas de *Cymodocea nodosa* son de naturaleza recalcitrante, no toleran la desecación ni las bajas temperaturas, y las mejores condiciones para almacenar las semillas son en agua de mar esterilizada a 18°C**, para mantener un potencial germinativo relativamente elevado durante al menos 11 meses (60% de germinaciones 11 meses después del almacenamiento).

II.5.3. La estacionalidad en la germinación demuestra la existencia de una dormancia secundaria en las semillas de *Cymodocea nodosa*. Sin embargo, la curva de germinación en el laboratorio, bajo condiciones óptimas, supone la existencia de una dormancia impuesta por la maduración fisiológica del embrión.

En muchos casos, una semilla viable no germina aunque todas las condiciones necesarias para el crecimiento sean adecuadas. Este fenómeno es el que conocemos con el nombre de dormancia de las semillas. Se han dado varias definiciones de dormancia, basadas, en parte, en los factores que la controlan. Así, Hilhorst & Toorop (1997) definen la dormancia como la ausencia de germinación de una semilla viable bajo condiciones óptimas. Baskin & Baskin (2004) definen una semilla durmiente como

aquella que no tiene la capacidad de germinar en un periodo específico de tiempo bajo una combinación normal de factores ambientales (temperatura, luz/oscuridad, etc.) que serían favorables para su germinación. Una semilla no durmiente es, por el contrario, aquella que tiene la capacidad de germinar en un amplio rango de factores ambientales posibles para su genotipo. Cuando una semilla no germina por la ausencia de alguno de estos factores, se dice que está en estado de quiescencia, pseudodormancia o ecodormancia.

La dormancia de las semillas introduce un retraso en el proceso de germinación que permite a las semillas disponer de mayor tiempo para dispersarse a grandes distancias. Igualmente favorece la supervivencia de las plántulas previniendo la germinación bajo condiciones ambientales desfavorables. Hilhorst & Toorop (1997), distinguen dos tipos de dormancia, en función del momento en que ésta se desarrolla:

- La dormancia primaria es aquella dormancia que comienza mientras la semilla está desarrollándose en la planta madre y que requiere de mecanismos fisiológicos como la maduración del embrión para iniciar la germinación (Hilhorst & Toorop, 1997; Orth *et al.*, 2000). Normalmente son semillas con una cubierta externa muy gruesa, la cual previene de la maduración del embrión impidiendo la penetración del agua y la difusión de oxígeno. Son necesarios factores externos, como agentes microbianos, temperaturas extremas o pasar por el tracto digestivo de animales para debilitar la cubierta. El ácido abscísico (ABA) también juega un papel importante en la prevención de una germinación precoz y en la imposición de la dormancia primaria. En general, según Hilhorst & Toorop (1997), la ausencia de ABA durante el desarrollo de la semilla resulta en la ausencia de dormancia en semillas maduras, mientras que su presencia tiene una influencia variable en la adquisición de la dormancia primaria. En algunas especies, la dormancia se rompe tras un periodo de almacenamiento en seco a temperaturas elevadas. En otras ocasiones la dormancia se ve interrumpida con tratamientos a temperaturas bajas. Varios estudios sugieren que en ambos casos ocurre una degradación del ácido abscísico. Otros estudios sugieren que los tratamientos que rompen la dormancia, como el almacenamiento en seco, están asociados con un aumento de la sensibilidad hacia las giberelinas (GAs) que promueven la germinación (Hilhorst & Toorop, 1997). Estos autores concluyen que la interrupción de la dormancia primaria esta asociada a un incremento en la sensibilidad al GA, al mismo tiempo que decrecen los niveles de ABA u otros inhibidores.

- La dormancia secundaria es aquella que se desarrolla cuando la semilla se ha desprendido de la planta madre y requiere de factores ambientales, como la luz, la temperatura, el agua, o la disponibilidad de oxígeno y nitratos para salir del estado de dormancia (Hilhorst & Toorop, 1997; Orth *et al.*, 2000). En estos casos se han observado que los tratamientos con frío y almacenamiento en seco resultan igualmente efectivos para romper esta dormancia. Varios autores afirman que las semillas son capaces de detectar los cambios de temperatura a lo largo del año y elegir el mejor momento para su crecimiento (Hilhorst & Toorop, 1997).

Baskin & Baskin (2004) proponen otro sistema para la clasificación de la dormancia de las semillas, consistente en 5 clases, subdivididas en varios niveles y estos a su vez pueden estar divididos en tipos. Las 5 clases de dormancia que proponen estos autores son: fisiológica, morfológica, morfofisiológica, física y una combinación de dormancia física + fisiológica.

La dormancia de las semillas en las fanerógamas marinas puede ser de gran importancia para la persistencia de la población (Orth *et al.* 2000), ya que permite la germinación a lo largo de un extenso periodo de tiempo (existencia de bancos de semillas) y asegura la supervivencia en áreas perturbadas así como la colonización de nuevos hábitats. Kuo & Kirkman (1996) caracterizaron los géneros de las fanerógamas marinas en 3 clases, basándose en la anatomía de las semillas, almacenamiento de nutrientes y estrategias de germinación. La primera clase engloba las especies que desarrollan semillas con un tegumento membranoso o carnoso y en las que no se distinguen periodos de dormancia (por ejemplo *Enhalus*, *Posidonia* spp. y *Thalassia* spp). La segunda incluye especies que producen semillas sin tegumento y que tampoco presentan ningún periodo de dormancia. Además, las plántulas de este grupo se desarrollan durante algún tiempo sobre la planta madre (por ejemplo *Amphibolis* spp. y *Thalassodendron* spp.). Por último, la tercera clase es la que agrupa a la mayoría de las fanerógamas marinas (42 especies y 7 géneros), y se caracteriza por producir semillas con una membrana externa muy dura y presentar algún periodo de dormancia (Orth *et al.* 2000, 2006a; Kuo & den Hartog, 2006).

Varios estudios han demostrado que la dormancia está presente en la estrategia de vida de algunas especies de fanerógamas marinas. Según McMillan (1981), las semillas de *Halodule wrightii* sufren largos periodos de dormancia, que pueden durar varios años, ya que 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 (McMillan, 1981). También McMillan (1987, 1991), trabajando con *Halophila engelmannii*, observó una dormancia endógena en la semilla de unas 2 o 3 semanas que se rompía al transferir las semillas a la luz. En este caso, el proceso germinativo se veía afectado por factores extrínsecos como la luz, y por factores intrínsecos asociados al embrión. En experiencias llevadas a cabo en el laboratorio con semillas recolectadas de *H. spinulosa*, éstas presentaron periodos de dormancia de unas 5 semanas (Birch, 1981), tras lo cual mostraban altos índices de germinación. Birch creía que los factores intrínsecos, como la maduración del embrión o la presencia de inhibidores, eran más importantes que los factores extrínsecos en la inducción de la germinación de las semillas de esta especie.

Harrison (1991) estudió los mecanismos de la dormancia en semillas de *Zostera marina*. Confirmó la existencia de una dormancia fisiológica (debido a que es necesario reducir la salinidad para inducir la germinación) y una dormancia física (impuesta por la cubierta seminal) en las semillas recién liberadas al sedimento. Tras dos meses en el banco de semillas éstas restricciones fisiológicas desaparecían, ya que, en el mes de marzo, las semillas eran capaces de germinar en el laboratorio sin disminuir la salinidad ni debilitar el tegumento. Sin embargo, otras especies como *Z. 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 *et al.* 1990b). Los estudios de germinación con *Z. capricorni* (Conacher *et al.* 1994) mostraron también que las semillas no tienen una dormancia primaria, ya que a baja salinidad (1-10 psu) e incisiones en la cubierta seminal dan una rápida y casi completa germinación.

Las semillas de *Phyllospadix iwatensis* presentaron un periodo de dormancia de unas 6 semanas tras la recolección (Kuo *et al.*, 1990). La rotura de la dormancia de las semillas de *Phyllospadix* y la emergencia del cotiledón y la plúmula debe implicar tanto procesos mecánicos como enzimáticos (Kuo *et al.*, 1990). En este caso también se intuye una dormancia secundaria ya que los autores sugieren que las semillas de *P. iwatensis* germinan cuando la temperatura del agua es superior a los 10 °C en los meses de junio-julio. Reed *et al.* (1998), reportaron que las semillas de *P. torreyi* no germinan inmediatamente después de su liberación y que la mayoría presentan un periodo de dormancia de varias semanas tras la dehiscencia. La germinación en el laboratorio no se

daba hasta la tercera semana bajo condiciones de luz. Por el contrario, la germinación fue inmediata tras forzar una dormancia de 83 días, poniendo las semillas en oscuridad a 4°C. Esto pudo ser debido a que el embrión continuó madurando durante el periodo de dormancia.

Ailstock & Shafer (2006) estudiaron la germinación y el almacenamiento de las especies *Ruppia maritima* y *Potamogeton perfoliatus*. De los resultados dedujeron que las semillas de ambas especies permanecen en estado de dormancia en condiciones normales de salinidad e inducen la germinación cuando baja la salinidad tras tormentas, las cuales afectan además a las plantas adultas, reduciendo así la competencia entre generaciones. Por otra parte, Koch & Seelinger (1988) estudiaron la germinación de las semillas de dos poblaciones de *R. maritima* y observaron que, en ambas poblaciones, las semillas parecen no requerir de un periodo de dormancia.

Diversos estudios hacen referencia a la dormancia de las semillas de *Cymodocea nodosa*. Bornet (1864), en su trabajo de *Phucagrostis major* Caval. (= *Cymodocea nodosa*) ya menciona que las semillas no germinan durante el invierno. Pirc *et al.* (1986) afirmaron que las semillas de *C. nodosa* presentan distintos periodos de dormancia, entre 7 y 8 meses, y comienzan a germinar en abril-mayo, cuando aumenta la temperatura del agua. Según estos autores, en zonas templadas como el Mediterráneo, la dormancia de estas semillas puede verse como una adaptación a las condiciones ambientales del invierno, que son desfavorables para la germinación. Atendiendo a Caye & Meinesz (1986), las semillas de *C. nodosa* comienzan a germinar tras un periodo de dormancia en la primavera siguiente a su formación, y son necesarios aportes de agua dulce para romper esta dormancia. Igualmente Caye *et al.* (1992) observaron que las semillas de *C. nodosa* muestran una dormancia secundaria inducida por las condiciones normales de salinidad en el medio de 38 psu. Buia & Mazzella (1991) estudiaron el ciclo reproductivo de *C. nodosa*, y observaron que duraba 12 meses, con unos 2 meses para la antesis, 2 meses para la formación del fruto, y un periodo de dormancia de 8 meses. Según Orth *et al.* (2000), en la especie *C. nodosa* se distingue un periodo de dormancia que puede durar más de 12 meses y un banco de semillas transitorio, es decir, que se renueva anualmente.

En general, todos los autores coinciden en la existencia de una dormancia secundaria en las semillas de *Cymodocea nodosa*, inducida por la salinidad del entorno y por las condiciones ambientales del invierno, desfavorables para la germinación y la

supervivencia de las plántulas. En el Mediterráneo, las semillas de *C. nodosa* germinan en los meses de primavera-verano cuando aumenta la temperatura del agua y disminuye la salinidad por escorrentías y fuertes lluvias (Caye & Meinesz, 1986; Caye *et al.* 1992; Pirc *et al.* 1986). En el archipiélago Canario, las semillas de esta especie germinan entre los meses de febrero y septiembre (Reyes *et al.*, 1995). Desde este punto de vista, podemos afirmar que **la estacionalidad observada en la germinación de las semillas de *Cymodocea nodosa* en la naturaleza demuestra la existencia de una dormancia secundaria impuesta por las condiciones del entorno, como pueden ser la salinidad, la luz y la temperatura.**

Además de las definiciones de dormancia citadas anteriormente, otros autores consideran la dormancia de las semillas como la incapacidad de aumentar su contenido en agua por encima del nivel necesario para la germinación (Obroucheva & Antivopa, 2004). Así, la dormancia de las especies recalcitrantes y/o acuáticas queda definida por la presencia de una testa impermeable que impide la entrada de agua al embrión. La recalcitrancia de estas semillas es debida a un grueso y denso abrigo, que impide la pérdida de agua y facilita un largo periodo de dormancia de las semillas intactas. En muchas ocasiones, el eje embrionario es no durmiente y capaz de germinar tras la escisión de la semilla. Por ejemplo, en las semillas recalcitrantes del castaño de indias (*Aesculus hippocastanum*), a pesar de mantener un elevado contenido en agua durante el invierno, la dormancia se determina por la presencia e influencia de la cubierta seminal, mientras que los órganos embrionarios separados de la semilla son no durmientes y son capaces de coger agua e incrementar el peso fresco rápidamente. Otras especies recalcitrantes que presentan este tipo de dormancia física impuesta por la cubierta seminal son, por ejemplo, *Combretum bracteosum* o *Cryptocarya floribunda* (Dalling & van Staden, 1999; Thapliyal *et al.*, 2004). En *C. bracteosum* parece que el pericarpio restringe la emergencia de la radícula, ya que los embriones extirpados presentan una tasa de germinación mayor que las semillas con el pericarpio intacto (Dalling & van Staden, 1999). Igualmente, la cubierta seminal de *C. floribunda* restringe la imbibición y el intercambio gaseoso imponiendo una dormancia física que resulta en la inhibición de la germinación (Thapliyal *et al.*, 2004).

En la histología del Capítulo I vimos que las semillas de *Cymodocea nodosa* presentan un embrión desarrollado desde que se suelta de la planta madre (en abril-mayo) y se entierra en el sedimento. Presentan además una gruesa envuelta seminal,

característica de este tipo de especies recalcitrantes, que impide la pérdida y la entrada de agua al embrión. Esto demuestra que las semillas, una vez liberadas, están completamente desarrolladas esperando las condiciones favorables que les permitan romper la dormancia impuesta por las cubiertas seminales. Desde esta otra perspectiva, **las semillas de *C. nodosa* presentan una dormancia física impuesta por la impermeabilidad de las cubiertas seminales (epicarpio y endocarpio)**. Además de *C. nodosa*, varias especies de fanerógamas marinas, como ya vimos anteriormente, se caracterizan por presentar una dormancia impuesta por las cubiertas seminales (*Syringodium filiforme* y *Halodule wrightii*, McMillan, 1981; *Phyllospadix*, Kuo *et al.*, 1990; *Zostera noltii*, Loques *et al.*, 1990b; *Zostera marina*, Harrison, 1991; *Zostera capricorni*, Conacher *et al.*, 1994).

Existen en los vegetales diferentes mecanismos que son empleados para romper la dormancia impuesta por la cubierta seminal. Las envueltas de muchas semillas son muy duras y parece claro que el embrión debe ejercer algún tipo de fuerza o presión para perforar y penetrar esta envuelta (generalmente la testa). En otros casos, el debilitamiento se produce por enzimas producidos bajo el control del embrión (Barceló-Coll *et al.*, 2001). Estudios realizados en embriones de *Brassica napus* sugieren que el efecto inhibitor del ABA sobre la elongación celular está asociado con la supresión del ablandamiento de las paredes celulares. En semillas de tomate, una endo- β -mananasa producida en el endospermo es la responsable de este ablandamiento. En el endospermo de tabaco, este papel es desempeñado por una β 1,3-glucanasa. Ambas enzimas pueden encontrarse a su vez bajo regulación hormonal por la acción antagónica del ABA y las giberelinas (Barceló-Coll *et al.*, 2001).

Según Kuo *et al.* (1990), la rotura de la dormancia de las semillas de *Phyllospadix*, que conlleva la emergencia del cotiledón y de la plúmula del fruto, debe implicar ambos procesos mecánicos y enzimáticos. En la especie *Ruppia maritima*, el secado de las semillas es un proceso efectivo para estimular la acción del sistema enzimático y romper el tegumento externo, lo que provoca el crecimiento del embrión (Koch & Seelinger, 1988). Éste proceso es el más efectivo para inducir la germinación de las semillas de *R. maritima* que provienen de hábitats tipo saladares y marismas, los cuales se caracterizan por periodos de sequía de 2 meses (Koch & Seelinger, 1988). Por lo tanto, este comportamiento puede considerarse un mecanismo adaptativo a estos ambientes. En las semillas de *Cymodocea nodosa* deben existir igualmente procesos

mecánicos y enzimáticos para romper la impermeabilidad de la cubierta externa. La cubierta externa de *C. nodosa*, como hemos visto en la descripción del fruto y la semilla, se corresponde con un epicarpio carnoso, un endocarpio duro y coriáceo, y la testa o cutícula que envuelve la semilla. La cubierta más externa, el epicarpio, tarda varios meses en descomponerse en el sedimento, y hasta que esto no ocurre la semilla no germina en ningún caso, independientemente de las condiciones de salinidad del medio de cultivo. La línea de dehiscencia por donde se produce la germinación constituye un punto de debilidad en el endocarpio coriáceo. La disminución de la salinidad debe hidratar las células que forman esta línea de apertura, al igual que debe degradarse por el efecto de los microorganismos existentes en la propia semilla o en el entorno. La existencia de mecanismos internos, como la producción por parte del embrión de enzimas responsables de la degradación de esta zona puede ser motivo de estudio en trabajos posteriores.

Las fanerógamas marinas provienen evolutivamente de una única línea de plantas monocotiledóneas terrestres (Orth *et al.*, 2006b), que colonizaron el medio marino hace alrededor de 100 millones de años (Orth *et al.*, 2006b; Duarte & Gattuso, 2008), lo cual indica, según Duarte & Gattuso (2008), una aparición relativamente temprana de las fanerógamas marinas en la evolución de las angiospermas. Así, han adquirido diferentes mecanismos necesarios para adaptarse a las nuevas condiciones del entorno marino, marcado por la salinidad, el fuerte hidrodinamismo y el ambiente acuático. Estas adaptaciones implican tanto aspectos fisiológicos como morfológicos, entre las que destacan la existencia en la epidermis de cloroplastos y de células encargadas de la osmorregulación, la carencia de estomas, y la presencia de un tejido parenquimatoso especial denominado aerénquima que sirve para la flotabilidad y donde se lleva a cabo el intercambio gaseoso necesario para proveer con oxígeno a las estructuras inferiores que crecen en sustratos anóxicos (Orth *et al.*, 2006b; Duarte & Gattuso, 2008). Además, estas plantas hacen frente al hidrodinamismo del entorno con un sistema de anclaje al sustrato bien desarrollado, gracias a la presencia de raíces y rizomas, y son las únicas capaces de completar su ciclo reproductivo completamente sumergidas (*hydrophilous pollination*), con la consiguiente capacidad de dispersión y germinación de los propágulos (Pettitt *et al.*, 1980; Verduin *et al.*, 1996; Buia & Mazzella, 1991; Orth *et al.*, 2006a; Duarte & Gattuso, 2008).

Sin embargo, puede considerarse que aún existen carencias en la aclimatación al entorno, principalmente en el éxito de la reproducción sexual de distintas especies, como es el caso de *Posidonia* y *Cymodocea* entre otras. Así, por ejemplo, existen varias referencias a la escasa o variable floración de *Posidonia oceanica*, y a la pérdida de los frutos que son abortados antes de completar su desarrollo, consumidos por herbívoros, o dispersados hasta la orilla donde no son capaces de germinar (Buia & Mazzella, 1991; Balestri & Cinelli, 2003). En el caso de *Cymodocea nodosa*, varios autores hacen referencia a la escasa germinación y/o presencia de plántulas en la pradera (Caye & Meinez, 1985; Duarte & Sand Jensen, 1990), y a la elevada mortalidad que sufren en los primeros meses tras la germinación (Caye & Meinez, 1985; Duarte & Sand Jensen, 1996). De la misma forma creemos que la dormancia física que impide la germinación de las semillas una vez liberadas puede considerarse como una desventaja para la especie, y un defecto en la adaptación a la colonización del entorno marino. Las semillas, a pesar de liberarse aparentemente desarrolladas y preparadas para la germinación, no lo hacen hasta la primavera siguiente, debido probablemente a la capa impermeable que las protege y que tiene que degradarse. **Esto implica que la mayoría de las semillas sufran un proceso de sedimentación durante el año, el cual les impide germinar cuando las condiciones ambientales son favorables**, obteniéndose unos porcentajes de germinación en la naturaleza que rondan el 10%, tal y como vimos en el Capítulo I. Además, la recalcitrancia de estas semillas al almacenamiento, tanto natural como *in vitro*, impide que se conserven durante largos periodos de tiempo. Como vimos anteriormente, **las semillas recalcitrantes se encuentran hidratadas y no disminuyen su metabolismo durante el periodo de dormancia, lo que hace que las semillas se degraden de forma natural e irremediablemente con el paso del tiempo si no encuentran las condiciones adecuadas para la germinación**. Este hecho, sumado a la presión antrópica que sufren estos ecosistemas, aumenta los riesgos de conservación natural de la especie.

Aparte de estas restricciones que afectan al conjunto de la semilla, existen otras que corresponden específicamente al embrión. En este capítulo hemos germinado mensualmente durante un año semillas colectadas de la naturaleza, lo que nos ha permitido definir con más precisión la dormancia de las semillas de *Cymodocea nodosa* en poblaciones del archipiélago Canario. Hemos observado cómo el banco de semillas es permanente a lo largo de todo el año, y se renueva anualmente con la formación de nuevos frutos en los meses de abril y mayo. Los potenciales germinativos en el

laboratorio han sido elevados a lo largo de todo el año (Fig. II.6), lo que demuestra que las semillas se encuentran completamente desarrolladas desde que son liberadas al medio y capaces de germinar cuando se degrada el tegumento externo que las protege. Además, hemos conseguido superar la dormancia secundaria impuesta por la impermeabilidad de las cubiertas seminales y la salinidad del entorno. Sin embargo, a pesar de que las condiciones de germinación en el laboratorio son las consideradas como óptimas (18 psu, medio de cultivo PES, $24 \pm 2^\circ\text{C}$, fotoperiodo 18:6 y $30 \mu\text{moles de fotones m}^{-2} \text{s}^{-1}$), no se mantienen los mismos porcentajes de germinación a lo largo del año, como cabría esperar, alcanzándose un máximo en el mes de marzo con un 90% (Fig. II.6). **Estas variaciones anuales, en condiciones óptimas de germinación, demuestran la existencia de una dormancia impuesta por la maduración fisiológica del embrión.** De la curva de germinación mensual de semillas de *C. nodosa* procedentes de la naturaleza podemos distinguir tres fases. La Fase I se corresponde con los meses de noviembre a abril, donde se dan los mayores porcentajes de germinación, con un máximo del 90% en el mes de marzo. En la Fase II, de mayo a julio, se observa una degradación natural del embrión y una pérdida de potencial germinativo. Por último, en las semillas recolectadas y germinadas directamente de la naturaleza, se da un reclutamiento natural de semillas producidas en los meses de primavera, que va a elevar nuevamente el potencial germinativo de la camada (Fase III). Así, a partir de agosto se observa una tendencia al alza, llegando a alcanzar en noviembre un 76.6%, valores que nos hacen pensar que se repetirá el ciclo en los meses siguientes (Fig. II.6).

La tendencia de esta curva anual de germinación de semillas procedentes de la naturaleza se asemeja a las germinaciones encontradas por Reyes & Sansón (1994) en una pradera del sureste de Tenerife. En la Fig. II.13A se representa el porcentaje de germinación obtenido en el laboratorio con semillas colectadas mensualmente y el número de plántulas m^{-2} reportadas por estos autores a lo largo de un ciclo anual. En este sentido, nuestro trabajo indica una germinación máxima en el mes de marzo, de la misma forma que Reyes & Sansón (1994) observan el máximo número de plántulas m^{-2} en el mes de abril.

El mismo patrón de germinación anual se observa en las semillas recogidas y almacenadas en noviembre y germinadas a lo largo de 1 año. La tendencia de la curva se asemeja a la obtenida con semillas recolectadas mensualmente (Fig. II.13B). En el caso de las semillas almacenadas desde noviembre en agua de mar a 18°C y T^a ambiente

diferenciamos dos fases anuales (Fase I y Fase II), que se repiten con ambas temperaturas (18°C y T^a ambiente) (Fig. II.5A-B). En este caso no existe Fase III, por no haber lógicamente un reclutamiento natural de semillas. La Fase I se corresponde con los meses de noviembre a abril, donde la germinación aumenta respecto al mes control (noviembre). La Fase II se corresponde con los meses de mayo a noviembre, donde se observa una disminución de la germinación debida probablemente a la degradación natural del embrión. En condiciones de almacenamiento a 18°C, sin embargo, puede mantenerse un potencial germinativo relativamente elevado hasta el final del experimento (60%), por lo que pueden considerarse las condiciones más cercanas al óptimo de almacenamiento.

En definitiva, observamos que tanto en las semillas recolectadas de la naturaleza como en las almacenadas durante un ciclo anual, se repite el mismo patrón de germinaciones con máximos en los meses de marzo y abril. A pesar de seleccionar únicamente las semillas viables y sin tegumento, y mantenerlas en condiciones óptimas para su germinación (temperatura de 24°C y salinidad de 18 psu), no se mantiene estable el potencial germinativo a lo largo del año. Así, el aumento del potencial germinativo sólo puede explicarse por las condiciones internas de la semilla, como pueden ser una maduración fisiológica del embrión, el cese en la producción de sustancias inhibitorias de la germinación, la degradación del tegumento interno de la semilla por producción enzimática, etc. El máximo número de plántulas germinadas en la naturaleza que obtienen Reyes & Sansón (1994) se da también en marzo y abril, por lo que podemos afirmar que estas germinaciones no se deben sólo a las condiciones ambientales favorables (de temperatura y salinidad), sino también a la maduración fisiológica del embrión.

Según las definiciones de dormancia reseñadas anteriormente y atendiendo a Hilhorst & Toorop (1997), las semillas de *Cymodocea nodosa* presentan una dormancia primaria, ya que, además de factores ambientales favorables para la germinación (correspondientes a una dormancia secundaria), requieren de factores intrínsecos relacionados con la regulación de los niveles hormonales para iniciar la germinación. Atendiendo a Baskin & Baskin (2004), la dormancia de las semillas de *C. nodosa* sería de naturaleza física y fisiológica, ya que, además de los factores físicos como la degradación de las cubiertas seminales, es necesaria la activación interna de los factores fisiológicos asociados a la maduración del embrión.

A partir de las diferentes observaciones morfológicas de las semillas, tanto *in situ* como *in vitro*, definimos varios estadios de desarrollo que están presentes en el stock de semillas de la población:

- Estadio I. Fruto desarrollado que permanece unido a la planta madre (periodo aproximado de abril a septiembre).
- Estadio II. Fruto que se desprende de la planta madre y se entierra en el sedimento (aproximadamente de agosto a diciembre).
- Estadio III. Semilla sin tegumento externo (a partir de septiembre-octubre).
- Estadio IV. Semilla germinada (en la naturaleza, durante los meses de febrero a septiembre según observaciones de Reyes *et al.*, 1995).
- Estadio V. Semilla abierta con el embrión degenerado.

Aparentemente, según esta clasificación y los resultados obtenidos en este trabajo, únicamente las semillas que se encuentran en el Estadio III y sus embriones serían útiles como material de partida para la obtención de plántulas. Sin embargo, esta fase puede alargarse en el tiempo por más de una temporada, ya que como hemos visto en la Fig. II.6, las semillas obtenidas directamente de la naturaleza y que se encuentran en el Estadio III, pueden germinarse bajo condiciones óptimas de laboratorio en cualquier momento del año.

II.5.4. Las técnicas de germinación y conservación de semillas in vitro pueden mejorar la recalcitrancia natural de las semillas y la pérdida del potencial germinativo en la población.

Tras llevar a cabo las diferentes experiencias de germinación con semillas recolectadas mensualmente a lo largo de un año y con semillas almacenadas a diferentes temperaturas, creamos un **Índice de Propagación Anual (IPA)** para definir la capacidad germinativa de las semillas a lo largo de un ciclo anual.

$$\text{IPA} = \text{Media del porcentaje de germinación mensual} * \text{N}^\circ \text{ meses con capacidad germinativa.}$$

De esta manera calculamos el IPA de las semillas en condiciones de almacenamiento, de las semillas recolectadas mensualmente y de las semillas germinadas en la naturaleza según las observaciones de Reyes *et al.*, (1995) (Tabla II.6).

Tabla II.6. Índice de Propagación Anual (IPA) de las semillas en condiciones de almacenamiento (18°C y Tª ambiente), de las semillas recolectadas mensualmente y de las semillas germinadas en la naturaleza según Reyes *et al.* (1995).

	Media porcentaje germinación mensual	Nº meses con capacidad germinativa	Valor IPA
Almacenamiento a 18°C	58.3	12	699.6
Almacenamiento a Tª ambiente	48.8	12	585.6
Recolectadas de la naturaleza	66.2	12	794.4
Atendiendo a Reyes <i>et al.</i> , (1995)	20	8	160.0

Así, se deduce que en relación a la capacidad germinativa de las semillas en la naturaleza y según el índice de propagación anual creado, se puede incrementar hasta 5 veces el potencial germinativo de las semillas bajo condiciones óptimas de laboratorio (de un valor de IPA de 160 a 794), lo que supone una mejora considerable de cara a la recuperación y conservación de la especie.

La recolección de semillas y la inducción de la germinación mediante el empleo de la técnica de propagación desarrollada nos permite recuperar gran cantidad de germoplasma vegetal que de otra manera se pierde de forma natural en la pradera. Si asumimos un índice de propagación como el IPA, podemos plantear la situación de las semillas de *Cymodocea nodosa*, y previsiblemente de otras fanerógamas marinas, tal y como se esquematiza en la Fig. II.14.

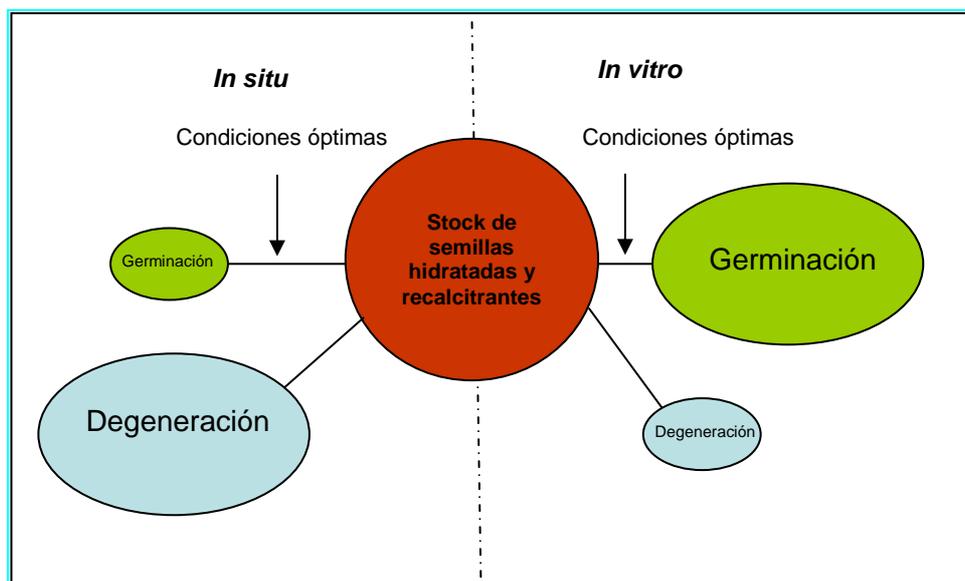


Fig. II.14. Situación de las semillas de *C. nodosa* tanto en condiciones *in situ* como *in vitro*.

Finalmente, tras analizar las causas que impiden a las semillas de *Cymodocea nodosa* germinar en la naturaleza, pensamos que, además de las condiciones ambientales de luz y temperatura y de las condiciones intrínsecas de la propia semilla (como su maduración fisiológica y la degradación del tegumento), otra causa que impide la germinación debe ser el enterramiento debido a la asincronía de la germinación en el tiempo, como ya mencionamos anteriormente. Además, tal y como vimos en el Capítulo I, el crecimiento del cotiledón es limitado, lo cual puede impedir que la plántula alcance la superficie o que se activen los mecanismos necesarios para inducir la germinación si la semilla se encuentra a mucha profundidad.

Creemos que una manera de impedir que se pierda germoplasma vegetal en la naturaleza y mejorar así los programas de conservación, puede ser interviniendo y extrayendo las semillas enterradas a mayor profundidad e induciendo la germinación *in vitro*. **Otra intervención inmediata y más simple, que puede acarrear grandes éxitos sin grandes costes adicionales, puede ser el desenterramiento de las semillas durante la época favorable (entre los meses de febrero a septiembre, cuando las semillas germinan normalmente en la naturaleza), y sembrarlas directamente en semilleros poco profundos, siguiendo la técnica del cepellón (ver Capítulo I), y situarlas en zonas de bajo hidrodinamismo que sean susceptibles de regeneración o conservación. Esta técnica no ha sido empleada hasta el momento, pero puede ser tenida en cuenta para futuros proyectos de restauración.**

II.5.5. La optimización del crecimiento y desarrollo de las plántulas de *Cymodocea nodosa* se ve imposibilitada por el efecto inhibitorio de los reguladores del crecimiento.

Las hormonas o reguladores del crecimiento han sido tradicionalmente empleados en plantas terrestres, al igual que en fanerógamas marinas, para estimular el crecimiento vegetal. Según los estudios realizados por Terrados (1995) y García-Jiménez *et al.* (2006) con distintos reguladores de crecimiento, el ácido giberélico fue la hormona más eficaz en la inducción del crecimiento de las hojas y de las raíces en fragmentos de rizoma de *Cymodocea nodosa*. Loques *et al.* (1990a) observaron que los reguladores de crecimiento son indispensables para el establecimiento de los cultivos de macromeristemas de *Posidonia oceanica*, ya que en medios sin reguladores acaban muriendo en 6 días. La mayor longevidad de estos macromeristemas la obtuvieron en

medios suplementados con 0.2 mg l^{-1} IAA + 2 mg l^{-1} KIN. Bird & Jewett-Smith (1994) también emplearon la combinación de una auxina y una citoquinina para acelerar la propagación de *Halophila engelmannii* (0.25 mg l^{-1} NAA + 10 mg l^{-1} BAP). En el caso de *Halophila decipiens* se comprobó que la adición de citoquininas en el medio de cultivo ($10 \text{ }\mu\text{M}$ de 2iP o BA) estimulaba la producción de haces comparado con el control (Bird *et al.*, 1998). También *Ruppia maritima* manifestó una estimulación del crecimiento en presencia de citoquininas (Bird *et al.*, 1996). En este caso, la planta vio estimulado su crecimiento en presencia de la citoquinina 2iP; por otro lado, la citoquinina BA tuvo un efecto menor en el crecimiento de la planta. Además, la hormona 2iP estimulaba el crecimiento en medios enriquecidos con sacarosa pero no en medios bicarbonatados (Bird *et al.*, 1996).

El empleo de hormonas puede aumentar significativamente el desarrollo de raíces y disminuir el tiempo necesario para que una plántula pueda fijarse al sustrato de manera segura. Reed *et al.* (1998) llevaron a cabo diferentes experimentos en el laboratorio con plántulas germinadas a partir de semillas de la especie *Phyllospadix torreyi* para favorecer el crecimiento y desarrollar técnicas para la restauración. Observaron que la aplicación de una solución comercial de auxinas (IBA + NAA), a baja concentración, incrementó la biomasa de raíces respecto a las plantas no tratadas con hormonas. Por otro lado, el resultado no mejoró repitiendo o elevando la dosis, llegando incluso a inhibirse la producción de raíces. Balestri & Bertini (2003) obtuvieron buenos resultados al añadir las auxinas NAA e IBA en el medio de cultivo de plántulas de *Posidonia oceanica*, ya que aumentaban la longitud de las raíces y disminuía su tiempo de producción. Tres años después, Balestri & Lardicci (2006) comprobaron que el uso de auxinas era indispensable para iniciar el desarrollo de raíces en un periodo aproximado de 1 mes, y que la exposición de fragmentos de *P. oceanica* a concentraciones de 5 mg l^{-1} de IBA y NAA estimulaba la producción de raíces y no afectaba ni a la producción de hojas ni a la supervivencia. Ambos estudios concluyeron que tratar las plántulas con estas auxinas puede resultar en un aumento de la probabilidad de éxito a la hora de trasplantar, ya que aceleran la producción de raíces considerada como la principal causa del fracaso en los trasplantes de *P. oceanica*. El rápido desarrollo de las raíces en los explantos de *P. oceanica* es beneficioso no sólo para el reestablecimiento de la dinámica de los nutrientes en la planta, sino también para mejorar el anclaje de los trasplantes (Balestri & Lardicci, 2006).

Sin embargo, no siempre las hormonas han tenido efectos positivos en el desarrollo de las plantas, pudiendo incluso desacelerar o reducir su crecimiento. Balestri *et al.* (1998) observaron que al añadir 2,4-D se inhibía el desarrollo de las plántulas de *Posidonia oceanica*, y se suprimía completamente el desarrollo de las raíces adventicias. La supresión en el desarrollo de las raíces también fue documentada por Koch & Durako (1991), en cultivos axénicos de *Ruppia maritima*, al añadir la auxina NAA. García-Jiménez *et al.* (2006) observaron que de todas las hormonas empleadas en el estudio con fragmentos de *Cymodocea nodosa*, la auxina IBA parecía tener un efecto inhibitorio en el crecimiento de la planta respecto al resto de hormonas. Bird *et al.* (1998) tampoco obtuvieron buenos resultados con la adición de las auxinas IBA, IAA y NAA en el crecimiento de *Halophila decipiens*, que en algunas ocasiones fueron inhibitorias.

En nuestro estudio se observa en general un efecto inhibitorio de las hormonas, tanto de auxinas, como de giberelinas y citoquininas en el desarrollo de las plántulas. La tasa de emisión de haces foliares disminuye significativamente tras la inmersión en GA₃ (10⁻⁴ M) y en BAP (10⁻⁴ M) (Fig. II.7B1-B2). Igualmente el crecimiento de las raíces se ve inhibido por la presencia de algunas auxinas, como el NAA (10⁻⁴ M) e IAA (10⁻⁴ M) (Fig. II.7C1). Además, las auxinas IAA (10⁻⁴ y 10⁻⁶ M) y 2,4-D (10⁻⁶ M), y la giberelina GA₃ (10⁻⁶ M) resultan inhibitorias del número de raíces emitidas (Fig. II.7D1-D2). Así, el único efecto positivo que observamos es el de la hormona GA₃ (10⁻⁴M) en el crecimiento de las hojas, y del 2,4-D (10⁻⁶M) en menor medida (Fig. II.7A1-A2).

En definitiva, podemos concluir que las plántulas no han mostrado un incremento del desarrollo radicular ni de la biomasa foliar, no detectándose, en ningún tratamiento, un desarrollo vegetativo con un patrón diferente al del ensayo control. Los tratamientos con reguladores de crecimiento no han beneficiado el crecimiento y desarrollo de las plántulas, resultando en muchos casos inhibitorio. Por lo tanto, podemos obviar estos tratamientos como una posible optimización de la técnica de propagación desarrollada *in vitro*.

II.5.6. *Las plántulas de Cymodocea nodosa carecen de un efecto claro de dominancia apical en su crecimiento y en el desarrollo de yemas laterales.*

El crecimiento vegetativo y la proliferación en fanerógamas marinas, al igual que en otras angiospermas clonales, es muy dependiente de la actividad de los meristemos apicales, y son, además, los responsables de la dicotomía entre el crecimiento horizontal y vertical en estas plantas (Terrados *et al.*, 1997; Brun *et al.* 2007). La actividad de los meristemos está controlada por el proceso de dominancia apical, por el cual, el crecimiento del meristemo apical tiene una influencia inhibitoria en el crecimiento de los meristemos laterales (Terrados *et al.*, 1997 y referencias internas). En esta línea, Brun *et al.* (2007) comprobaron que la arquitectura clonal de *Zostera noltii* parece estar regulada por la interacción de una fuerte dominancia apical y la distancia de integración clonal. La dominancia apical, además de controlar el crecimiento de las yemas (restricción del crecimiento de ramas en los ejes secundarios o *ramets*), regula la longitud de los internudos en las ramas secundarias. De esta manera, la longitud de los internudos depende de la distancia al ápice (efecto tiempo) y del tipo de eje (efecto dominancia apical).

El crecimiento vegetativo de *Cymodocea nodosa* es debido a la actividad de un meristemo apical foliar, cuya actividad es controlada también por el proceso de dominancia apical, que produce un rizoma horizontal (eje principal) con largos entrenudos y un meristemo lateral en cada entrenudo (Terrados *et al.*, 1997 y referencias internas). Terrados *et al.* (1997) comprobaron la dominancia apical de la especie *in situ* tras eliminar el meristemo apical del rizoma horizontal. Seccionar el ápice favorecía un incremento del número ramas, debido principalmente a que los rizomas verticales más cercanos sufrían un cambio en la forma de crecimiento orientándose hacia un crecimiento horizontal. No obstante, aunque la elongación de las ramas aumentaba cuando se eliminaba el meristemo apical, el crecimiento total de la planta se veía reducido.

Se ha sugerido que las plantas con una estrategia de crecimiento similar a la de *Cymodocea nodosa* se benefician de tener una fuerte dominancia apical para reducir la interferencia de *ramets* y promover la exploración del hábitat y la adquisición de recursos en ambientes pobres (Terrados *et al.*, 1997 y referencias internas). Los resultados muestran que el efecto inhibitorio del meristemo apical sobre el desarrollo de

meristemas laterales es efectivo en meristemas situados a distancias de 6-8 internudos (0.5 m) desde el ápice. También comprobaron que este efecto se mantiene a mayores distancias (1 m) porque el crecimiento de las ramas laterales continúa inhibido. Esto evidencia la existencia de la integración clonal en *C. nodosa* en distancias de 0.5 a 1 m, y definidas también en un periodo de tiempo (3-4 meses durante la fase de crecimiento) (Terrados *et al.*, 1997).

Las plántulas de *Cymodocea nodosa*, germinadas a partir de semillas, carecen de un crecimiento clonal hasta que empieza a desarrollarse el rizoma. De esta forma no podemos aplicar la misma teoría de la dominancia apical que emplea Terrados *et al.* (1997) para explicar el crecimiento clonal de la especie. **En nuestro caso, al cortar el ápice del cotiledón y tratar las plántulas con diferentes reguladores del crecimiento, no obtenemos ningún tipo de efecto estimulador ni inhibitorio del crecimiento de las plántulas** (Fig. II.8). No se ha cumplido ninguna de las hipótesis que se plantean en la bibliografía para explicar la dominancia apical. Según diversos autores (Cline, 1994; Cline & Dong-II, 2002; Cline & Harrington, 2007), tratar las plántulas decapitadas con citoquininas debería estimular su crecimiento e incrementar la biomasa foliar y radicular, lo mismo que un tratamiento con auxinas restablecería la dominancia apical. Las plántulas control decapitadas (sin aplicación de reguladores de crecimiento) también deberían aumentar su biomasa por la pérdida de la dominancia apical. **Por lo tanto podemos afirmar que no existe en las plántulas recién germinadas ningún efecto de dominancia apical sobre el crecimiento y desarrollo de yemas laterales.**

II.5.7. Optimización del estatus nutritivo, del crecimiento y del desarrollo de las plántulas de *C. nodosa* tratadas con fertilizantes de liberación lenta (N:P:K).

En lo que se refiere al estatus nutritivo de las plántulas de *Cymodocea nodosa* germinadas en el laboratorio y aclimatadas en tanques, disponemos como referencia el trabajo de Duarte (1990), quien realizó una recopilación bibliográfica sobre el contenido en nutrientes de 27 especies de fanerógamas marinas. Determinó que la media de la concentración de C, N y P en las hojas es respectivamente de 33.6, 1.92 y 0.23% del peso seco. Observó además que la variabilidad del N y del P es elevada entre las diferentes especies, mientras que el contenido en carbono permanece estable, debido posiblemente a que este elemento representa componentes estructurales no afectados

por el estatus nutricional de la planta. Duarte sugiere la existencia de un límite inferior para el contenido en nutrientes que permite la supervivencia de las fanerógamas marinas. Así, las plantas que presenten valores inferiores a 1.82% del peso seco para el N y 0.20% para el P ven limitado su crecimiento.

En nuestro trabajo, tras analizar el contenido en nutrientes de las plántulas germinadas en el laboratorio, y de las aclimatadas tanto con fertilizantes como sin fertilizantes, podemos determinar que en ningún caso presentan deficiencias en fósforo, ya que todos los valores son mayores del 0.2% del peso seco (Tabla II.4). La concentración de N es también elevada, entre 4.27 y 1.83% del peso seco (Tabla II.4), siendo en todos los casos superior a 1.82% (valor medio de N considerado para las fanerógamas marinas), por lo que tampoco se encuentran limitadas por la disponibilidad de N. Paralelamente, tal y como sugirió Duarte en su estudio, nuestras plantas presentan rangos de carbono similares en todos los casos (entre 35 y 34%). Estos resultados nos muestran que, en relación al estudio realizado por Duarte (1990), **las plántulas de *Cymodocea nodosa* germinadas en el laboratorio y aclimatadas con o sin fertilizantes, se encuentran bien nutridas y no presentan ninguna deficiencia en nutrientes.**

Si comparamos nuestros resultados con los obtenidos por Duarte & Sand-Jensen (1996) en plántulas de *Cymodocea nodosa* situadas en sustratos arenosos limitados por fósforo de la Bahía de Alfacs (Mar Mediterráneo), observamos cómo las plántulas en este entorno son extremadamente deficientes en fósforo ya que tienen todos los valores mucho menores al 0.20% de P ($0.071 \pm 0.003\%$ peso seco). Según estos autores esta deficiencia en el contenido en P va aumentando con la edad de la plántula, pudiendo ser la principal razón que impide a la mayoría de las plántulas (>90%) iniciar un nuevo parche, y no continuar su crecimiento vegetativo por más de tres años. Además, los valores de N hallados en nuestras plántulas fueron también superiores al contenido en N de las plántulas de Duarte & Sand-Jensen (1996), que presentaron valores de $1.56 \pm 0.06\%$ del peso seco. Sin embargo, años más tarde, en el estudio llevado a cabo por Nielsen & Pedersen (2000) con plántulas de *C. nodosa* situadas igualmente en la Bahía de Alfacs (mar Mediterráneo), no encontraron deficiencias ni en fósforo ni en nitrógeno, ya que obtuvieron valores de 0.20% de P y de 2.75% de N del peso seco.

En lo que respecta a la adquisición de biomasa vegetal, nuestro estudio muestra que el peso seco de las plántulas el día 0 (control), es decir, al mes y medio desde la

germinación, alcanzó un valor medio de 21.37 ± 1.26 mg. Después de 30 días de aclimatación sin fertilizantes, la media del peso seco fue de 33.27 ± 2.01 mg, mientras que con fertilizantes fue de 49.31 ± 3.57 mg (Tabla II.4). Estos datos nos permiten concluir que **existe un efecto positivo de la fertilización en la adquisición de biomasa vegetal**, que se traduce en las diferencias significativas observadas entre en el peso seco de las plántulas fertilizadas y las no fertilizadas ($p < 0.05$). Los datos de peso seco de nuestras plántulas son algo menores a los hallados por Duarte & Sand-Jensen (1996) en la naturaleza, que variaban entre 35 y 127 mg.

En lo que se refiere a la respuesta de las plántulas a la adición de nutrientes, en varios estudios se ha comprobado que un aumento moderado en la disponibilidad de nutrientes estimula el crecimiento en fanerógamas marinas y su producción (Roberts *et al.*, 1984; Terrados & Ros, 1993; Agawin *et al.*, 1996; Wilson & Bennett, 2008). En nuestro estudio, al comparar las tasas de crecimiento foliar y radicular, y las tasas de emisión de raíces, de hojas y de haces foliares, en presencia o ausencia de fertilizantes (Fig. II.9A-B), observamos que **no hay diferencias significativas excepto para la tasa de emisión de raíces, que es significativamente mayor en plántulas aclimatadas con fertilizantes** ($p < 0.05$). Se entiende que un mayor número de raíces va a resultar beneficioso a la hora de realizar los trasplantes, ya que permite una mayor sujeción al sustrato y una mayor superficie absortiva para la adquisición de nutrientes. Sin embargo, estos datos se contrarrestan con los obtenidos por Peralta *et al.* (2003) con plántulas de *Zostera marina*, donde el mayor porcentaje de biomasa de raíces ($>10\%$ del peso seco) se obtuvo en sedimentos no fertilizados con N, cuando el contenido en N de la hoja se encontraba por debajo del valor crítico.

En otras ocasiones se ha demostrado que un aumento moderado en la disponibilidad de nutrientes aumenta el contenido de N y/o P total en distintas especies de fanerógamas marinas (Short, 1987; Erftemeijer *et al.*, 1994; Terrados & Ros, 1993; Agawin *et al.*, 1996; Udy & Dennison, 1997; Invers *et al.*, 2004; Heck *et al.*, 2006). Según Duarte (1990), las plantas que están limitadas por N y P presentan tejidos con escasa concentración en N o P en relación al contenido en C, lo que muestra ratios elevadas de C/N o C/P. Conforme aumenta la disponibilidad de nutrientes en respuesta a la fertilización, los tejidos se enriquecen en N y P en relación al contenido en C, lo que hace obviamente disminuir las ratios. No obstante, en nuestro estudio, las plantas disminuyen el porcentaje de P después de la aclimatación con fertilizantes (de 0.53% en

las plántulas sin aclimatar a 0.28% en plantas fertilizadas; Tabla II.4). El comportamiento del nitrógeno es similar al del fósforo, disminuyendo de 4.27% en las plántulas sin aclimatar a 1.83% en plántulas fertilizadas (Tabla II.4). Observamos que **a pesar de la fertilización, disminuye el contenido en N y P de las plántulas aclimatadas provocando un aumento considerable de los ratios C/N y C/P**, y mostrando diferencias significativas entre todos los grupos (Tabla II.4). Además, la ratio N/P en las plántulas aclimatadas con fertilizantes (6.43 ± 0.19) disminuye significativamente respecto al control (7.98 ± 0.19), debido a la mayor reducción del contenido en nitrógeno. A pesar de que los ratios indican una disminución del contenido en nutrientes, si los comparamos con las plántulas analizadas por Duarte & Sand-Jensen (1996), observamos cómo los ratios de N/P y C/P en las plántulas analizadas por estos autores (ratios N/P: 49.5 ± 2.9 ; C/P: 1247 ± 51.7), son mucho mayores que las nuestras, indicando que las plántulas de la naturaleza son mucho más deficientes en P. Según estos autores, el contenido en carbono y nitrógeno, pero no de fósforo, aumenta significativamente con el aumento de la edad en las plántulas. Como resultado, la ratio N/P aumenta significativamente con la edad de las plántulas. Estas ratios tan elevadas les permiten sugerir que el P es el nutriente limitante, como previamente demostraron otros autores para esta pradera de fanerógamas marinas (Pérez *et al.*, 1991; Pérez & Romero, 1994). **En nuestro caso, a medida que las plántulas crecen, la ratio N/P disminuye ligeramente en aquellas no fertilizadas y significativamente en las fertilizadas, lo que demuestra que son más deficientes en N que en P.**

Respecto a la respuesta de las plántulas a la fertilización según las diferentes distancias, no observamos diferencias significativas en ninguno de los parámetros medidos, ya sea en el peso seco, como en las tasas de crecimiento o de contenido en nutrientes. Únicamente se presenta una ligera tendencia al alza en los resultados obtenidos en las plántulas situadas a 10 cm de distancia de la fuente emisora, respecto a las situadas a 5 y 15 cm (Tabla II.5, Fig. II.14).

En definitiva, nuestro trabajo revela que la fertilización del sedimento con barritas de nutrientes N:P:K favorece el crecimiento (principalmente el número de raíces emitidas) e incrementa el peso seco de las plántulas. Sin embargo, disminuye el porcentaje de fósforo y nitrógeno respecto a las plántulas del día 0 (sin aclimatar), y respecto a las aclimatadas sin fertilizantes (Tabla II.4). Esto puede ser debido a que **las plántulas fertilizadas, que han crecido más, no están tomando los nutrientes del**

sedimento sino que están empleando sus propias reservas para el crecimiento.

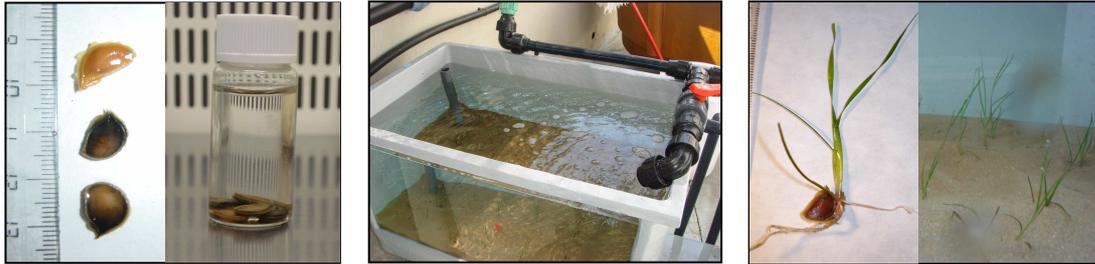
Varios autores han reportado en sus experimentos que debido al elevado estatus nutritivo de las plántulas, éstas emplean sus propios recursos para su crecimiento durante las primeras etapas de su vida. Por ejemplo, Balestri *et al.* (1998) mencionan los escasos requerimientos nutricionales en cultivos axénicos de plántulas de *Posidonia oceanica*, lo que atribuyeron a la utilización de los nutrientes almacenados en las semillas, con una mínima o nula asimilación de los nutrientes exógenos durante los primeros meses tras la germinación. Igualmente, según varios autores (Wilson & Bennett, 2008 y referencias internas), las plántulas de *Posidonia coriacea* presentan gran cantidad de reservas almacenadas en la semilla y presentan una escasa asimilación de nutrientes del medio.

El mayor crecimiento en nuestras plántulas fertilizadas (Fig. II.9B) y la menor concentración de nutrientes en sus tejidos (Tabla II.4), puede ser debido, además, a otros factores incontrolables en condiciones de mesocosmos, como la disponibilidad de luz en los acuarios, la temperatura, o la proliferación de microorganismos debido a la descomposición de las barritas en el sedimento, con los consiguientes cambios en la disponibilidad de oxígeno. Varios autores han reportado la necesidad de la presencia de microorganismos para la correcta asimilación de nutrientes en las plántulas de algunas especies. Según Balestri *et al.* (1998), la escasa asimilación de nutrientes exógenos por parte de las plántulas de *Posidonia oceanica* puede deberse a la existencia de una obligada asociación microbiana, que no existe en sus experimentos con plántulas axénicas. Durako & Moffler (1987) también observaron que el enriquecimiento *in vitro* con nitrógeno, tanto orgánico (glutamina, glutamato, urea y extracto de levadura) como inorgánico (NH_4^+), en plántulas de *Thalassia testudinum*, no aumentaba el crecimiento respecto al control. En general, observaron una disminución del área verde y de la anchura de las hojas tras un mes, y una ratio C/N relativamente más elevada que el control, lo que sugiere una disminución de las reservas de la semilla y una ligera o nula asimilación de nutrientes del medio. Durako & Moffler (1987) asocian la ausencia de crecimiento a las condiciones asépticas del medio de cultivo, ya que los microorganismos, a la vez que compiten por los nutrientes, alteran las formas de los nutrientes añadidos. Las bacterias y hongos aumentan la liberación y la asimilación de nutrientes, disminuyendo la resistencia al agua e iones a través del córtex de la raíz o simplemente incrementando la superficie para la absorción de nutrientes. La ausencia de un aumento en el crecimiento de plántulas de *T. testudinum* en medios libres de

bacterias tras el enriquecimiento con nitrógeno, contrasta con los estudios anteriores de plántulas no esterilizadas, donde sí hubo respuestas significativas, lo que da evidencias de la existencia de una asociación microbiana en esta especie (Durako & Moffler, 1987).

En vista de los resultados presentados, podemos afirmar que las plántulas germinadas en condiciones *in vitro*, y las aclimatadas con o sin fertilizantes, presentan un buen estatus nutritivo que permite su crecimiento y desarrollo en el tiempo. Sin embargo, el hecho de que el estatus nutritivo de las plántulas disminuya con el tiempo, y en las plántulas fertilizadas principalmente, hace dudar de la incorporación real de nutrientes externos, y hace pensar en la utilización de los recursos presentes en la propia semilla. Por lo tanto, no podemos afirmar que las plántulas se estén nutriendo con los fertilizantes N:P:K que hemos añadido al sustrato, aunque exista un aumento del peso seco y del número de raíces emitidas en las plántulas fertilizadas (diferencias significativas, $p < 0.05$). No descartamos otros factores aleatorios provocados por la variabilidad ambiental de los acuarios, que pueden contribuir a enmascarar el potencial efecto de la fertilización.

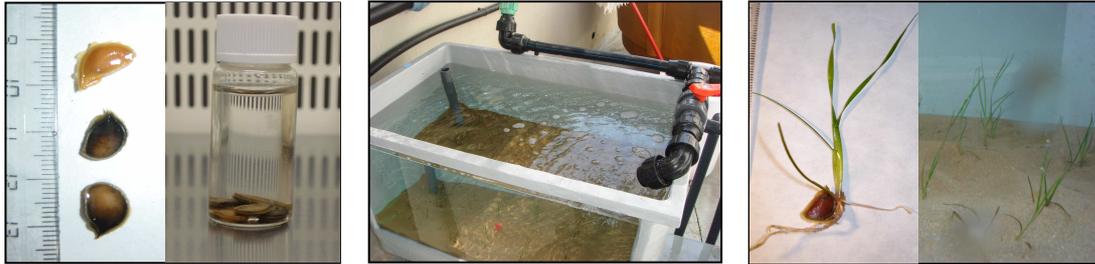
II.6. CONCLUSIÓN CAPÍTULO II



- 1) *Cymodocea nodosa* produce semillas recalcitrantes que no toleran la desecación ni las bajas temperaturas y sufren graves daños como consecuencia de la salida de agua de las células.
- 2) Las mejores condiciones para almacenar las semillas esterilizadas de *Cymodocea nodosa* son en agua de mar autoclavada a 18°C, para mantener un potencial germinativo del 60% durante al menos 11 meses.
- 3) La estacionalidad observada en la germinación de las semillas de *Cymodocea nodosa* en la naturaleza (tanto en el Mediterráneo como en Canarias), demuestra la existencia de una dormancia secundaria impuesta por las condiciones del entorno, como pueden ser la salinidad, la luz o la temperatura. Estas semillas presentan, además, una dormancia física impuesta por la impermeabilidad de las cubiertas seminales (epicarpio y endocarpio), y una dormancia impuesta por la maduración fisiológica del embrión, que se demuestra en la curva de germinación anual bajo condiciones óptimas de laboratorio (18 psu, medio de cultivo PES, $24 \pm 2^\circ\text{C}$, fotoperiodo 18:6 y $30 \mu\text{moles de fotones m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) con máximos entre los meses de enero y marzo, tanto con semillas almacenadas como recolectadas mensualmente.
- 4) La recolección de semillas y la inducción de la germinación mediante el empleo de la técnica de propagación desarrollada nos permite recuperar gran cantidad de germoplasma vegetal que de otra manera se perdería de forma natural en la pradera, incrementando en 5 veces la capacidad germinativa de las semillas a lo largo del año (según el IPA propuesto).
- 5) La optimización del crecimiento y desarrollo de las plántulas se ve imposibilitado por el efecto inhibitorio de los reguladores del crecimiento. El único efecto positivo que observamos es el de la hormona GA₃ (10^{-4} M) en el crecimiento de las hojas, y del 2,4-D (10^{-6} M) en menor medida. Además, las plántulas de *Cymodocea nodosa* carecen de un efecto claro de dominancia apical en su crecimiento y en el desarrollo de yemas laterales. Por lo tanto, podemos obviar estos tratamientos como posible optimización de la técnica de propagación desarrollada.

- 6) Del estudio del contenido en nutrientes de las plántulas germinadas *in vitro* se observa que se encuentran bien nutridas y no presentan ninguna deficiencia en nutrientes, tanto al comienzo como al final del periodo de aclimatación.
- 7) En lo que se refiere a la respuesta de las plántulas a la adición de nutrientes, observamos un efecto positivo en la adquisición de biomasa vegetal (que se traduce en las diferencias significativas entre en el peso seco de las plántulas fertilizadas y las no fertilizadas), y en la tasa de emisión de raíces, que es significativamente mayor en plántulas aclimatadas con fertilizantes ($p < 0.05$).
- 8) Sin embargo, a pesar de la fertilización y con el paso del tiempo, disminuye en las plántulas aclimatadas el contenido de P y principalmente de N, provocando un aumento considerable de las ratios C/P y C/N. Esto puede ser debido a que las plántulas fertilizadas, que han crecido más, no están tomando los nutrientes del sedimento sino que están empleando las reservas contenidas en la semilla y en sus propios tejidos para desarrollarse.

II.7. BIBLIOGRAFÍA CAPÍTULO II



Agawin, N.S.R., Duarte, C.M., Fortes, M.D., 1996. Nutrient limitation of Philippine seagrasses (Cape Boliano, NW Philippines): in situ experimental evidence. *Marine Ecology Progress Series* 138, 233-243.

Ailstock, S., Shafer, D., 2006. Protocol for large-scale collection, processing, and storage of seeds of two mesohaline submerged aquatic plant species. SAV Technical Notes Collection (ERDC/TN SAV-06-3). Vicksburg, MS: U.S. Army Engineer Research & Development Center.

Azcón-Bieto, J., Talón, M., 2001. *Fundamentos de Fisiología Vegetal*. Mc Graw Hill Interamericana.

Badini, L., Pistocchi, R., Bagni, N., 1994. Polyamine transport in the seaweed *Ulva rigida* (Chlorophyta). *Journal Phycology* 30, 599-605.

Balestri, E., Piazzzi, L., Cinelli, F., 1998. In vitro germination and seedling development of *Posidonia oceanica*. *Aquatic Botany* 60, 83-93.

Balestri, E., Bertini, S., 2003. Growth and development of *Posidonia oceanica* seedling treated with plant growth regulators: possible implications for meadow restoration. *Aquatic Botany* 76, 291-297.

Balestri, E., Cinelli, F., 2003. Sexual reproductive success in *Posidonia oceanica*. *Aquatic Botany* 75, 21-32.

Balestri, E., Lardicci, C., 2006. Stimulation of root formation in *Posidonia oceanica* cuttings by application of auxins (NAA and IBA). *Marine Biology* 149, 393-400.

Barceló-Coll, J., Nicolás-Rodrigo, G., Sabater-García, B., Sánchez-Tamés, R., 2001. *Fisiología Vegetal*. Editorial Pirámide, Madrid.

Baskin, J.M., Baskin, C.C., 2004. A classification system for seed dormancy. *Seed Science Research* 14, 1-16.

Beligni, M.V., Lamattina, L., 1999. Is nitric oxide toxic or protective?. *Trends in Plant Science* 4, 299-300.

Beligni, M.V., Lamattina, L., 2000. Nitric oxide stimulates seed germination and de-etiolation, and inhibits hypocotyl elongation, three light-inducible responses in plants. *Planta* 210, 215-221.

Belzunce, M., Navarro, R.M., Rappoport, H., 2008. *Posidonia oceanica* seeds from drift origin: viability, germination and early plantlet development. *Botanica Marina* 51, 1-9.

Berjak, P., Pammenter, N.W., 2008. From *Avicennia* to *Zizania*: seed recalcitrance in perspective. *Annals of Botany* 101, 213-228.

Birch, W.R., 1981. Morphology of germinating seeds of the seagrass *Halophila spinulosa* (R.Br.) Aschers (Hydrocharitaceae). *Aquatic Botany* 11, 79-90.

Bird, K.T., Jewett-Smith, J., 1994. Development of a medium and culture system for in vitro propagation of the seagrass *Halophila engelmannii*. *Canadian Journal of Botany* 72, 1503-1510.

Bird, K.T., Brown, M.S., Henderson, T.T., O'Hara, C.E., Robbie, J.M., 1996. Culture studies of *Ruppia maritima* L. in bicarbonate and sucrose based media. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 199, 153-164.

Bird, K.T., Johnson, J.R., Jewett-Smith, J., 1998. In vitro culture of the seagrass *Halophila decipiens*. *Aquatic Botany* 60, 377-387.

Bornet, E., 1864. Recherches sur le *Phucagrostis major* Cavol. *Annales des Sciences Naturelles* 5, Série Botanique 1, 5-51.

Brun, F.G., Cummaudo, F., Olivé, I., Vergara, J.J., Pérez-Lloréns, J.L., 2007. Clonal extent, apical dominance and networking features in the phalanx angiosperm *Zostera noltii* Hornem. *Marine Biology* 151, 1917-1927.

Buia, M.C., Mazzella, L., 1991. Reproductive strategies of the Mediterranean seagrasses: *Posidonia oceanica* (L.) Delile, *Cymodocea nodosa* (Ucria) Aschers., *Zostera noltii* Hornem. *Aquatic Botany* 40, 343-362.

Caye, G., Meinesz, A., 1985. Observations on the vegetative development, flowering and seeding of *Cymodocea nodosa* (Ucria) Ascherson, on the Mediterranean coast of France. *Aquatic Botany* 22, 277-289.

Caye, G., Meinesz, A., 1986. Experimental study of seed germination in the seagrass *Cymodocea nodosa*. *Aquatic Botany* 26, 75-87.

Caye, G., Bulard, C., Meinesz, A., Loques, F., 1992. Dominant role of seawater osmotic pressure on germination in *Cymodocea nodosa*. *Aquatic Botany* 42, 187-193.

Chamberlain, A.H.L., Gorham, J., Kane, D.G., Lewey, S.A., 1979. Laboratory growth studies on *Sargassum muticum* (Yendo) Fensholt. II. Apical dominance. *Botanica Marina* XXII, 11-19.

Churchill, A.C., 1983. Field studies on seed germination and seedling development in *Zostera marina*. *Aquatic Botany* 16, 21-29.

Cline, M.G., 1994. The role of hormones in apical dominance. New approaches to an old problem in plant development. *Physiologia Plantarum* 90(1), 230-237.

Cline, M.G., 1996. Exogenous auxin effects on lateral bud outgrowth in decapitated shoots. *Annals of Botany* 78, 255-266.

Cline, M.G., 1997. Concepts and terminology of apical dominance. *American Journal of Botany* 84(9), 1064-1069.

Cline, M.G., Dong-II, K., 2002. A preliminary investigation of the role of auxin and cytokinin in sylleptic branching of three hybrid poplar clones exhibiting contrasting degrees of sylleptic branching. *Annals of Botany -London-* 90(3), 417-422.

Cline, M.G., Sadeski, K., 2002. Is auxin the repressor signal of branch growth in apical control? *American Journal of Botany* 89, 1764-1771.

Cline, M.G., Harrington, C., 2007. Apical dominance and apical control in multiple flushing of temperate woody species. *Canadian Journal of Forest Research* 37, 74-83.

Cohen, E., Malis Arad, S., Heimer, Y.M., Mizrahi, Y., 1983. Polyamine biosynthetic enzymes in *Chlorella*: Characterization of ornithine and arginina decarboxylase. *Plant and Cell Physiology* 24 (6), 1003-1010.

Cohen, E., Malis Arad, S., Heimer, Y.M., Mizrahi, Y., 1984. Polyamine biosynthetic enzymes in *Chlorella*. Correlation between ornithine decarboxylase and DNA Synthesis at different light intensities. *Plant Physiology* 74, 385-388.

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. *Aquatic Botany* 49, 47-58.

Creelman, R.A., Mollet, J.E., 1997. Oligosaccharins, brassinolides, and jasmonates: non-traditional regulators of plant growth, development, and gene expression. *The Plant Cell* 9(7), 1211–1223.

Dalling, K.J., Van Staden, J., 1999. Germination requirements of *Combretum bracteosum* seeds. *South African Journal of Botany* 65, 83-85.

De Carlo, A., Benelli, C., Lambarri, M., 2000. Development of a shoot-tip vitrification protocol and comparison with encapsulation-based procedures for plum (*Prunus domestica* L.) cryopreservation. *Cryo Letters* 21, 215-222.

Duarte, C.M., 1990. Seagrass nutrient content. *Marine Ecology Progress Series* 67, 201-207.

Duarte, C.M., Sand-Jensen, K., 1990. Seagrass colonization: patch formation and patch growth in *Cymodocea nodosa*. *Marine Ecology Progress Series* 65, 193-200.

Duarte, C.M., Sand-Jensen, K., 1996. Nutrient constraints on establishment from seed and on vegetative expansion of the Mediterranean seagrass *Cymodocea nodosa*. *Aquatic Botany* 54, 279-286.

Duarte, C.M., Gattuso, J.P., 2008. Seagrass meadows. In: Encyclopedia of Earth. Cutler, J.C., (Eds). Washington, D.C.: Environmental Information Coalition, National Council for Science and the Environment. http://www.eoearth.org/article/Seagrass_meadows

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. American Journal of Botany 74, 234-240.

Erfteimeijer, P.L.A., Stapel, J., Smekens, M.J.E., Drossaert, W.M.E., 1994. The limited effect of in-situ phosphorus and nitrogen additions to seagrass beds on carbonate and terrigenous sediments in South Sulawesi, Indonesia. Journal of Experimental Marine Biology and Ecology 182(1), 123-140.

Evans, T.P., Malmberg, R.L., 1989. Do polyamines have roles in plant development? Annual Review Plant Physiology 40, 235-269.

Ferdie, M., Fourqurean, J.W., 2004. Responses of seagrass communities to fertilization along a gradient of relative availability of nitrogen and phosphorus in a carbonate environment. American Society of Limnology and Oceanography 49(6), 2082-2094.

Fišerová, H., Šebánek, J., Hradilík, J., Doležel, P., Mikušová, Z., Procházka, S., 2007. Release of cotyledonary shoots of pea (*Pisum sativum*) seedlings from inhibition as related to endogenous zeatin and ethylene and exogenous IAA and benzyladenine. Biología Bratislava 62(1), 51-55.

Flachsland, E., Terada, G., Scocchi, A., Rey, H., 2002. Criopreservación de semillas y protocormos de *Oncidium bifolium* (Orchidaceae) por encapsulación–deshidratación. XIII Reunión de Comunicaciones Científicas y Técnicas. Facultad de Ciencias Agrarias. UNNE

Flachsland, E., Terada, G., Scocchi, A., Rey, H., Mroginski, L., Engelmann, F., 2006. Cryopreservation of seeds and in vitro-cultured protocorms of *Oncidium bifolium* Sims. (Orchidaceae) by encapsulation-dehydration. Cryo Letters 27(4), 235-42.

Fourqurean, J.W., Powell, G.V.N., Kenworthy, W.J., Zieman, J.C., 1995. The effects of long-term manipulation of nutrient supply on competition between the seagrasses *Thalassia testudinum* and *Halodule wrightii* in Florida Bay. *Oikos* 72(3), 349-358.

García-Jiménez, P., Rodrigo, M., Robaina, R.R., 1998. Influence of plant growth regulators, polyamines and glycerol interaction on growth and morphogenesis of carposporelings of *Grateloupia* cultured *in vitro*. *Journal of Applied Phycology* 10, 95-100.

García-Jiménez, P., Navarro, P.E., Santana, C.H., Luque, A., Robaina, R.R., 2006. Anatomical and nutritional requirements for induction and sustained growth *in vitro* of *Cymodocea nodosa* (Ucria) Ascherson. *Aquatic Botany* 84, 79-84.

Granger, S., Traber M., Nixon, S.W., Keyes, R., 2002. A practical guide for the use of seeds in eelgrass (*Zostera marina* L.) restoration. I. Collection, processing, and storage. Schwartz, M., (Ed). Rhode Island Sea Grant, Narragansett, RI. pp. 20.

Harrison, P.G., 1991. Mechanisms of seed dormancy in an annual population of *Zostera marina* (eelgrass) from The Netherlands. *Canadian Journal of Botany* 69, 1972-1976.

Hayat, S., Ahmad, A., 2007. Salicylic Acid - A Plant Hormone. Hayat, S., Ahmad, A., (Eds.) Hardcover ISBN: 978-1-4020-5183-8 Springer Netherland pp. 401.

Heck, K.L.Jr., Valentine, J.F., Pennock, J.R., Chaplin, G., Spitzer, P.M., 2006. Effects of nutrient enrichment and grazing on shoal grass (*Halodule wrightii*) and its epiphytes: results of a field experiment. *Marine Ecology Progress Series* 326, 145-156.

Hilhorst, H.W.M., Toorop, P.E., 1997. Review on dormancy, germinability and germination in crop and weed seeds. *Advanced in Agronomy* 61, 111-165.

Hirano, T., Godo, T., Mii, M., Ishikawa, K., 2005. Cryopreservation of immature seeds of *Bletilla striata* by vitrification. *Plant Cell Reports* 23 (8), 534-539.

Hootsmans, M.J.M., Vermaat, J.E., van Vierssen, W., 1987. Seed-bank development, germination and early seedling survival of two seagrass species from the Netherlands: *Zostera marina* L. and *Zostera noltii* Hornem. *Aquatic Botany* 28, 275-285.

Invers, O., Kraemer, G.P., Pérez, M., Romero, J., 2004. Effects of nitrogen addition on nitrogen metabolism and carbon reserves in the temperate seagrass *Posidonia oceanica*. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 303, 97–114.

Jitsopakul, N., Thammasiri, K., Ishikawa, K., 2008. Cryopreservation of *Vanda coerulea* protocorms by encapsulation-dehydration. *Cryo Letters* 29(3), 253-260.

Johnson, M.W., Heck, K.L., Fourqurean, J.W., 2006. Nutrient content of seagrasses and epiphytes in the northern Gulf of Mexico: Evidence of phosphorus and nitrogen limitation. *Aquatic Botany* 85(2), 103-111.

Kapchina-Toteva, V., Somleva, M., Van Telgen, H.J., 2002. Anticytokinin effect on apical dominance release in vitro cultured *Rosa hybrida* L. *Biologia Plantarum* 45(2), 183-188.

Kenworthy, W.J., Fonseca, M.S., Whitfield, P.E., Hammerstrom, K., Schwarzschild, A.C., 2000. A comparison of two methods for enhancing the recovery of seagrasses into propellor scars: mechanical injection of a nutrient and growth hormone solution vs. defecation by roosting seabirds. NOAA Center for Coastal Fisheries and Habitat Research, Beaufort, NC. <http://shrimp.ccfhrb.noaa.gov/~mfonseca/lvfinalreport.pdf>.

Koch, E.W., Seeliger, U., 1988. Germination ecology of two *Ruppia maritima* L. populations in southern Brazil. *Aquatic Botany* 31, 321-327.

Koch, E.W., Durako, M.J., 1991. In vitro studies of the submerged angiosperm *Ruppia maritima*: auxin and cytokinin effects on plant growth and development. *Marine Biology* 110(1), 1–6.

Konstantinidou, E., Takos, I., Merou, T., 2008. Desiccation and storage behavior of bay laurel (*Laurus nobilis* L.) seeds. *European Journal of Forest Research* 127, 125-131.

Krishnapillay, D.B., 2000. Attempts at conservation of recalcitrant seeds in Malaysia. forest genetic resources no.28. Food and agriculture organization of the United Nations.

Kuo, J., Iizumi, H., Nilsen, B.E., Aioi, K., 1990. Fruit anatomy, seed germination and seedling development in the Japanese seagrass *Phyllospadix* (Zosteraceae). *Aquatic Botany* 37, 229-245.

Kuo, J., Kirkman, H., 1996. Seedling development of selected *Posidonia* species from southwest Australia. In: Seagrass biology: Proceedings of an International Workshop. Kuo, J., Phillips, R.C., Walker, D.I., Kirkman H., (Eds). Rottneest Island Western Australia. Faculty of Science, University of Western Australia, Perth. pp. 57-64.

Kuo, J., den Hartog, C., 2006. Seagrass morphology, anatomy, and ultrastructure. In: Seagrasses: Biology, Ecology and Conservation. Larkum, A.W.D., Orth, R.J., Duarte, C.M., (Eds). Netherlands, Springer Verlag. pp. 51-87.

Loques, F., Caye, G., Meinesz, A., 1990a. Axenic culture of selected tissue of *Posidonia oceanica*. Aquatic Botany 37, 171-188.

Loques, F., Caye, G., Meinesz, A., 1990b. Germination in the marine phanerogam *Zostera noltii* Hornemann at Golfe Juan (French Mediterranean). Aquatic Botany 38, 249-260.

Lorenzo-Sánchez, O., 2007. La esencia del jazmín: estudio de la señalización molecular de los jasmonatos. <http://www.fv2007.fgua.es/prog/docs/LORENZOscar.doc>

Marián, F.D., García-Jiménez, P., Robaina, R.R., 2000a. Polyamine levels in the seagrass *Cymodocea nodosa*. Aquatic Botany 68, 179-184.

Marián, F.D., García-Jiménez, P., Robaina, R.R., 2000b. Polyamine in marine macroalgae: Levels of putrescina, spermidine and spermine in thalli and changes in their concentration during glycerol-induced cell growth in vitro. Physiologia Plantarum 110, 530-534.

McMillan, C., 1981. Seed reserves and seed germination for two seagrasses, *Halodule wrightii* and *Syringodium filiforme*, from the western Atlantic. Aquatic Botany 11, 279-296.

McMillan, C., 1983a. Seed germination in *Halodule wrightii* and *Syringodium filiforme* from Texas and the U.S. Virgin Islands. Aquatic Botany 15, 217-220.

McMillan, C., 1983b. Seed germination for an annual form of *Zostera marina* from the Sea of Cortez, Mexico. Aquatic Botany 16, 105-110.

McMillan, C., 1987. Seed germination and seedling morphology of the seagrass, *Halophila engelmannii* (Hydrocharitaceae). *Aquatic Botany* 28, 179-188.

McMillan, C., 1991. The longevity of seagrass seeds. *Aquatic Botany* 40, 195-198.

Nielsen S.L., Pedersen, M.F., 2000. Growth, photosynthesis and nutrient content of seedlings and mature plants of *Cymodocea nodosa* - the importance of clonal integration. *Aquatic Botany* 68, 265-271.

Obroucheva, N.V., Antipova, O.V., 2004. The role of water uptake in the transition of recalcitrant seeds from dormancy to germination. *Russian Journal of Plant Physiology* 51(6), 848-856.

Orth, R.J., Harwell, M.C., Bailey, E.M., Bartholomew, A., Jawad, J.T., Lombana, A.V., Moore, K.A., Rhode, J.M., Woods, H.E., 2000. A review of issues in seagrass seed dormancy and germination: implications for conservation and restoration. *Marine Ecology Progress Series* 200, 277-288.

Orth, R.J., Harwell, M.C., Inglis, G.J., 2006a. Ecology of seagrass seeds and seagrass dispersal processes. In: *Seagrasses: Biology, Ecology and Conservation*. Larkum, A.W.D., Orth, R.J., Duarte, C.M., (Eds). Springer Netherlands. pp. 111-133.

Orth, R.J., Carruthers, T.J.B., Dennison, W.C., Duarte, C.M., Fourqurean, J.W., James, W., Heck Jr, H.K., Hughes, A.R., Kendrick, G.A., Kenworthy, W.J., Olyarnik, S., Short, F.T., Waycott, M., Williams, S.L., 2006b. A global crisis for seagrass ecosystems. *Bioscience* 56, 987-996.

Pammenter, N.W., Berjak, P., 1999. A review of recalcitrant seed physiology in relation to desiccation-tolerance mechanisms. *Seed Science Research* 9, 13-37.

Pammenter, N.W., Berjak, P., 2000. Aspects of recalcitrant seed physiology. *Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal* 12, 56-69.

Panis, B., Piette, B., Swennen, R., 2005. Droplet vitrification of apical meristems: a cryopreservation protocol applicable to all Musaceae. *Plant Science* 165, 45-55.

Peralta, G., Bouma, T.J., van Soelen, J., Pérez-Lloréns, J.L., Hernández, I., 2003. On the use of sediment fertilization for seagrass restoration: a mesocosm study on *Zostera marina* L. Aquatic Botany 75, 95-110.

Pérez, M., Romero, J., Duarte, C.M., Sand-Jensen, K., 1991. Phosphorus limitation of *Cymodocea nodosa* growth. Marine Biology 109, 129-133.

Pérez, M., Romero, J., 1994. Growth dynamics, production and nutrient status of the seagrass *Cymodocea nodosa* in a Mediterranean semi-estuarine environment. PSZN I: Marine Ecology 15, 51-64.

Pérez, M., Invers, O., Manuel Ruiz, J., Frederiksen, M.S, Holmer, M., 2007. Physiological responses of the seagrass *Posidonia oceanica* to elevated organic matter content in sediments: An experimental assessment. Journal of Experimental Marine Biology and Ecology 344, 149-160.

Pettitt, J.M., McConchie, C.A., Ducker, S.C., Knox, R.B., 1980. Unique adaptations for submarine pollination in seagrasses. Nature 286, 487-489.

Pirc, H., Buia, M.C., Mazzella, L., 1986. Germination and seedling development of *Cymodocea nodosa* (Ucria) Aschers. under laboratory conditions. Aquatic Botany 26(1-2), 181-188.

Piriz-Carrillo, V., Fassola, H.E., Chaves, A.R., Mugridge, A., 2004. Almacenamiento refrigerado de semillas de *Araucaria angustifolia* (Bert.) O.Kuntze: Conservación del poder germinativo. RIA 33(2), 67-84.

Reed, D.C., Holbrook, S.J., Solomon, E., Anghera, M., 1998. Studies on germination and root development in the surfgrass *Phyllospadix torreyi*: implications for habitat restoration. Aquatic Botany 62, 71-80.

Reyes, J., Sansón, M., 1994. Morfología y anatomía de *Cymodocea nodosa* (Cymodoceae, Magnoliophyta) en praderas de El Médano (S Tenerife, islas Canarias). Vieraea 23, 43-64.

Reyes, J., Sansón, M., Afonso-Carrillo, J., 1995. Distribution and reproductive phenology of the seagrass *Cymodocea nodosa* (Ucria) Ascherson in the Canary Islands. *Aquatic Botany* 50, 171-180.

Roberts, M.H.Jr., Orth, R.J., Moore, K.A., 1984. Growth of *Zostera marina* L. seedlings under laboratory conditions of nutrient enrichment. *Aquatic Botany* 20, 321-328.

Salisbury, F.B., Ross, C.W., 1992. *Plant Physiology*. Wadsworth, Belmont.

Scrosati, R., 2002. Morphological plasticity and apparent loss of apical dominance following the natural loss of the main apex in *Pterocladia capillacea* (Rhodophyta, Gelidiales) fronds. *Phycologia* 41, 96-98.

Short, F.T., 1987. Effects of sediment nutrients on seagrasses: literature review and mesocosm experiment. *Aquatic Botany* 27, 41-57.

Slater, A., Scott, N., Fowler, M., 2003. Plant tissue culture. Chapter 2. In: *Plant Biotechnology: The genetic manipulation of plants*. Slater, A., Scott, N., Fowler, M., (Eds). Oxford University Press, USA. pp. 346.

Smith, T.A., 1985. Polyamines. *Annual Review of Plant Physiology* 36, 117-143.

Takagi, H., Tien Thinh, N., Islam, O.M., Senboku, T., Sakai, A., 1997. Cryopreservation of in vitro grown shoot tips of taro (*Colocasia esculenta* Scott) by vitrification. 1. Investigation of basic condition of the vitrification procedure. *Plant Cell Reports* 16, 594-599.

Terrados, J., Ros, J.D., 1993. Limitación por nutrientes del crecimiento de *Cymodocea nodosa* (Ucria) Ascherson en sedimentos carbonatados en el Mar Menor, Murcia, SE de España. *Publicación Especial Instituto Español Oceanografía* 11, 9-14.

Terrados, J., 1995. Effects of some plant growth regulators on the growth of the seagrass *Cymodocea nodosa* (Ucria) Ascherson. *Aquatic Botany* 51(3), 311-318.

Terrados, J., Duarte, C.M., Kenworthy, W.J., 1997. Experimental evidence for apical dominance in the seagrass *Cymodocea nodosa*. *Marine Ecology Progress Series* 148, 263-268.

Thapliyal, R.C., Phartyal, S.S., Nayal, J.S., 2004. Germination, desiccation tolerance and storage of seed of a tropical evergreen tree - *Cryptocarya floribunda* Nees (Lauraceae). *Science and Technology* 32(2), 537-545.

Thin, N.T., Takagi, H., Yashima, S., 1999. Cryopreservation of *in vitro* grown shoot tips of banana (*Musa* spp.) by vitrification method. *Cryo Letters* 20, 163-174.

Tiburcio, A.F., Campos, J.L., Figueras, X., Resford, R.T., 1993. Recent advances in the understanding of polyamine functions during plant development. *Plant Growth Regulator* 12, 331-340.

Udy, J.W., Dennison, W.C., 1997. Physiological responses of seagrasses used to identify anthropogenic nutrient inputs. *Marine and Freshwater Research* 48(7), 605-614.

Vázquez-Yanes, C., Orozco-Segovia, A., Rojas Aréchiga, M., Sánchez-Coronado, M.E., Cervantes, V., 1997. La reproducción de las Plantas: Semillas y Meristemas. Fondo de Cultura Económica, Serie La Ciencia para Todos, México, D.F. pp. 167.

Verduin, J.J., Walker, D.I., Kuo, J., 1996. In situ submarine pollination in the seagrass *Amphibolis antarctica*: research notes. *Marine Ecology Progress Series* 133, 307-309.

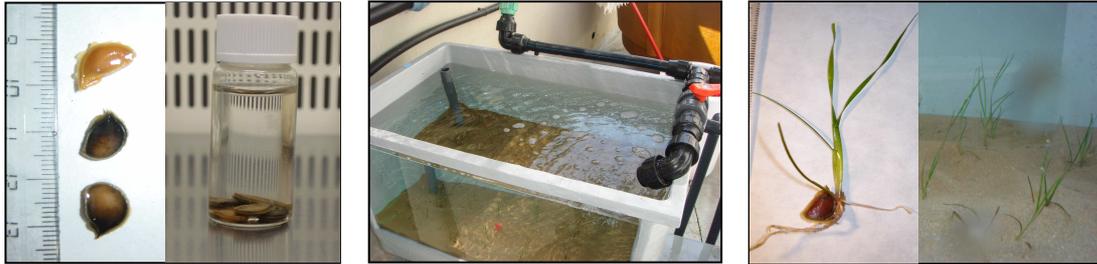
Villalobos, R., Herrera, J., Mora-Urpi, J., 1992. Germinación de la semilla de Pejibaye (*Bactris gasipaes*). III. Efecto del contenido de agua y de las condiciones de almacenamiento. *Agronomía Costarricense* 16(1), 69-76.

Walters, C., 2000. Levels of recalcitrance in seeds. *Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal* 12, 7-21.

Wilson, J.G., Bennett, I.J., 2008. Nutrient requirements of *in vitro* cultured *Halophila ovalis* and *Posidonia coriacea*: nitrogen source. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 92, 155-163.

Woodhead, J.L., Bird, K.T., 1998. Efficient rooting and acclimation of micropropagated *Ruppia maritima* Loisel. *Journal of Marine Biotechnology* 6(3), 152-156.

II.8. ANEXO CAPÍTULO II



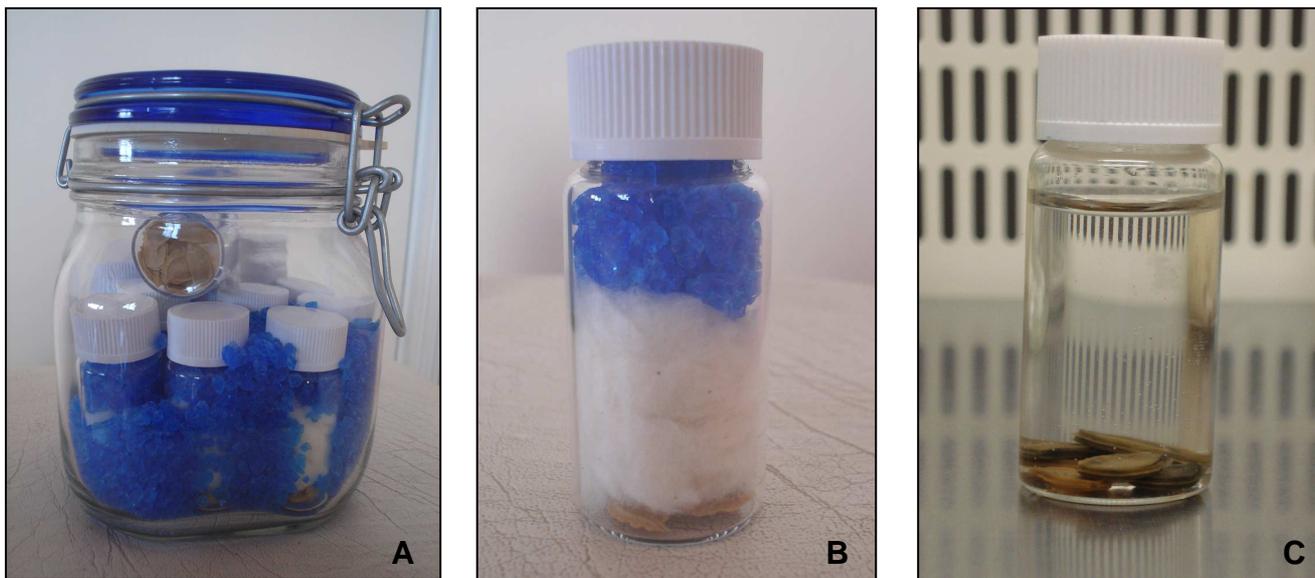


Fig. II.1. Métodos empleados para la conservación de las semillas. **A-B**. Almacenamiento de las semillas en seco. **C**. Almacenamiento de las semillas en agua de mar.



Fig. II.2. Plántula a los 20 días tras la germinación, empleada para los tratamientos de dominancia apical. La línea de puntos representa el lugar donde se realiza el corte para eliminar la punta del cotiledón

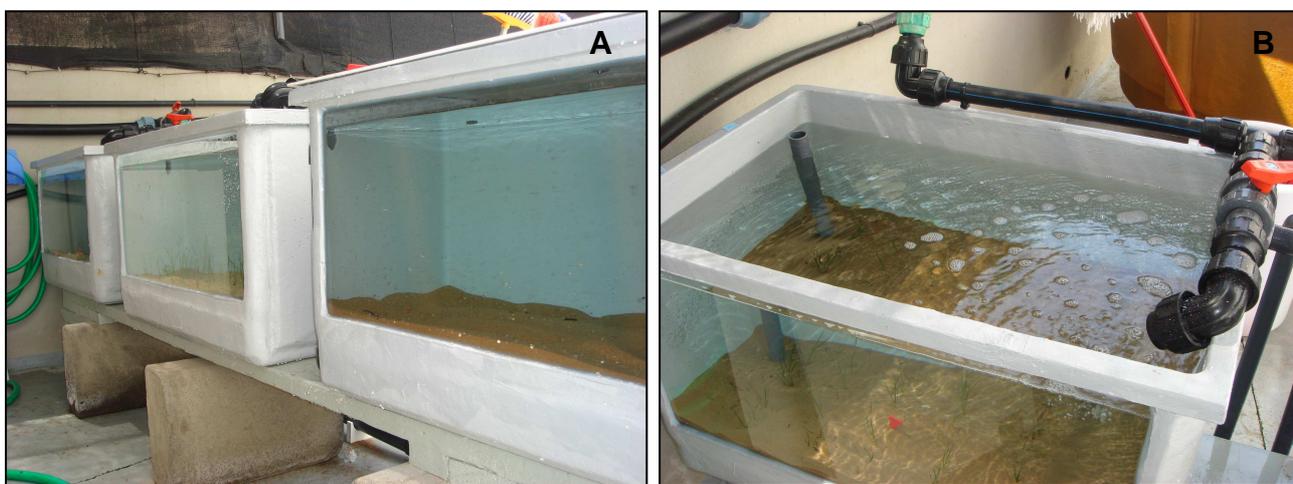


Fig. II.3. **A-B**. Acuarios empleados en los experimentos de fertilización con barritas de difusión lenta N:P:K.

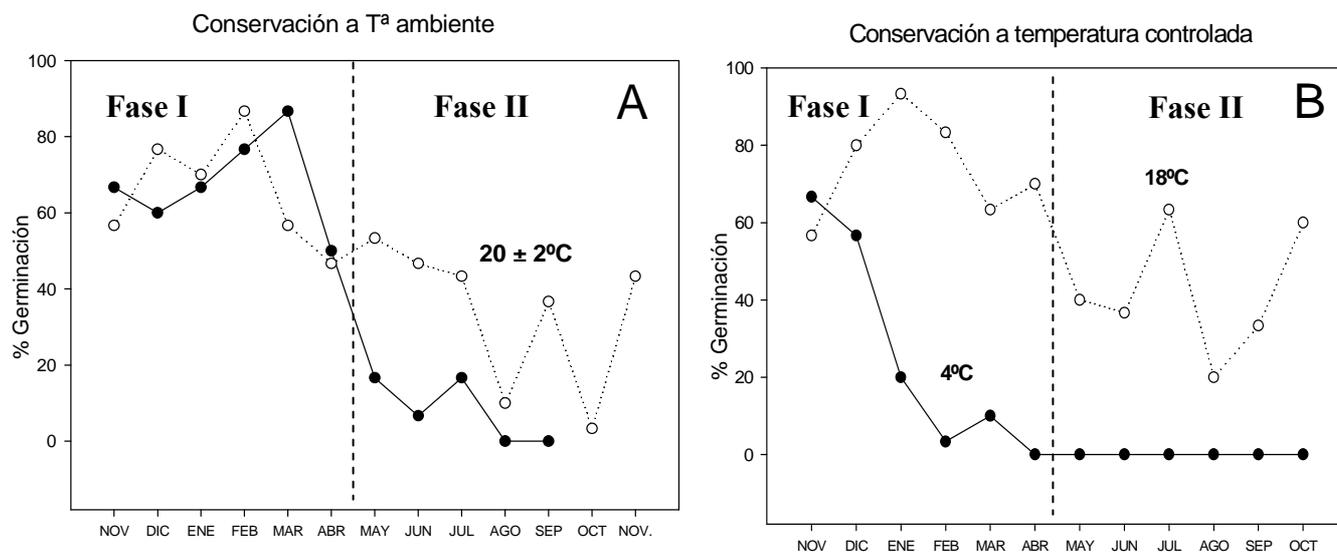


Fig. II.5. **A.** Potencial germinativo a lo largo de un año de semillas almacenadas en noviembre a temperatura ambiente ($20 \pm 2^\circ\text{C}$) (2 replicas) ($n = 30$ en cada experiencia). **B.** Potencial germinativo a lo largo de un año de semillas almacenadas en noviembre a 18°C y 4°C ($n = 30$ en cada experiencia).

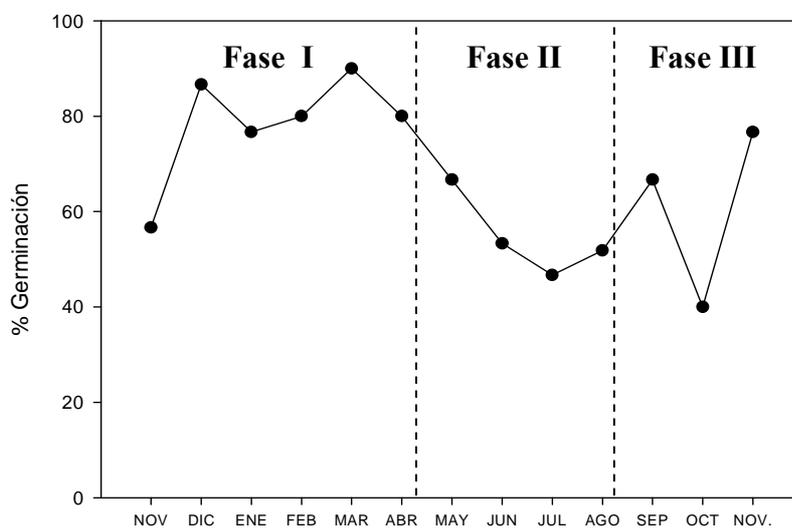


Fig. II.6. Potencial germinativo a lo largo de un año de semillas recogidas mensualmente en la naturaleza y germinadas en condiciones *in vitro* ($n = 30$ en cada experiencia).

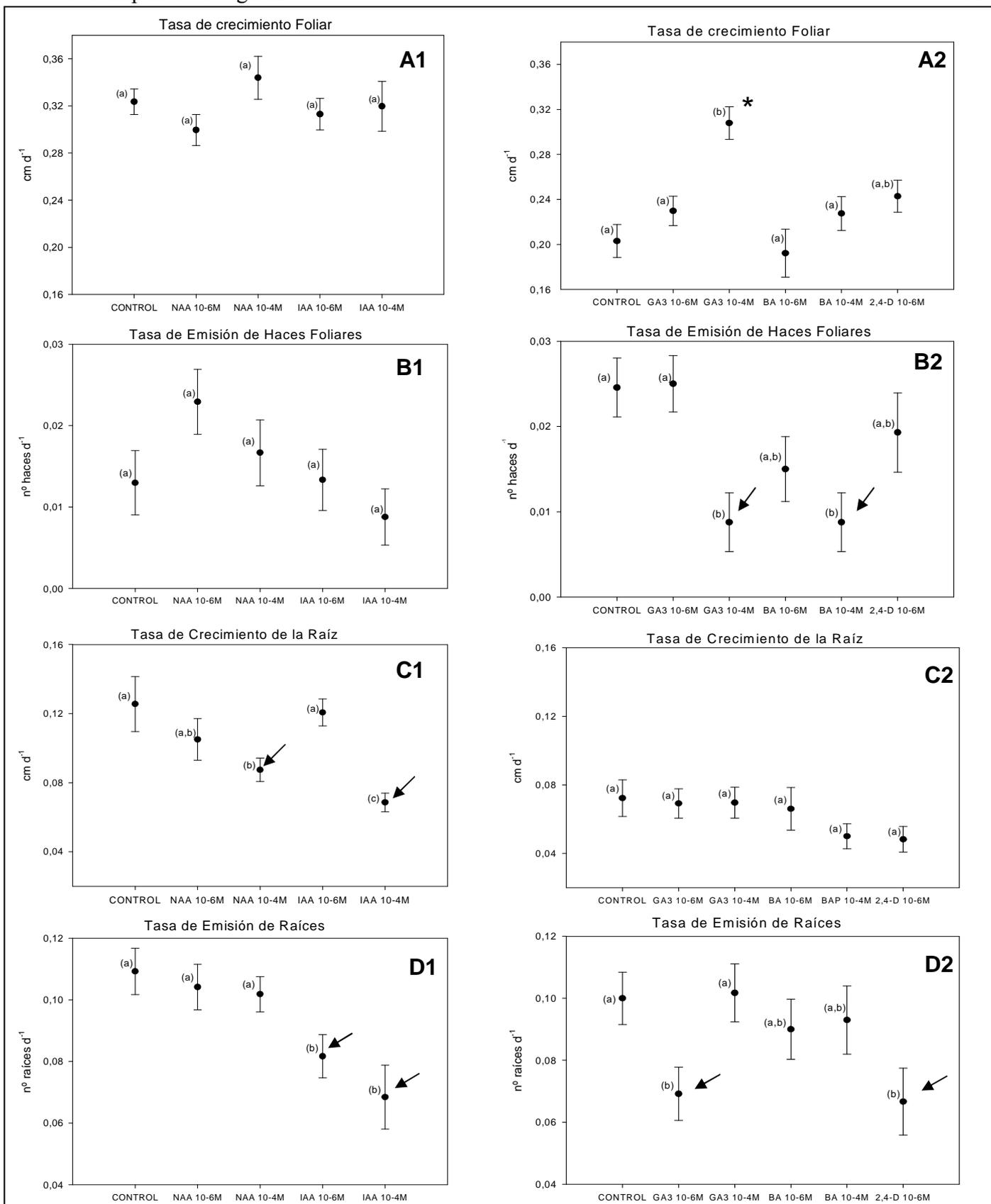


Fig. II.7. Tasas de crecimiento de las plántulas entre el día 30 (t_0) y 60 (t_2), tras inmersión con hormonas los días 30 (t_0) y 45 (t_1), en dos tandas de experimentos ($n = 20$ en cada experiencia). Distinta letra entre paréntesis hace referencia a diferencias significativas ($p < 0.05$). Las flechas indican efecto inhibitorio del tratamiento. El asterisco indica efecto estimulador. **A1-A2.** Tasa Crecimiento Foliar (cm d⁻¹). **B1-B2.** Tasa Emisión Haces (nº haces d⁻¹). **C1-C2.** Tasa Crecimiento Raíz (cm d⁻¹). **D1-D2.** Tasa Emisión Raíces (nº raíces d⁻¹).

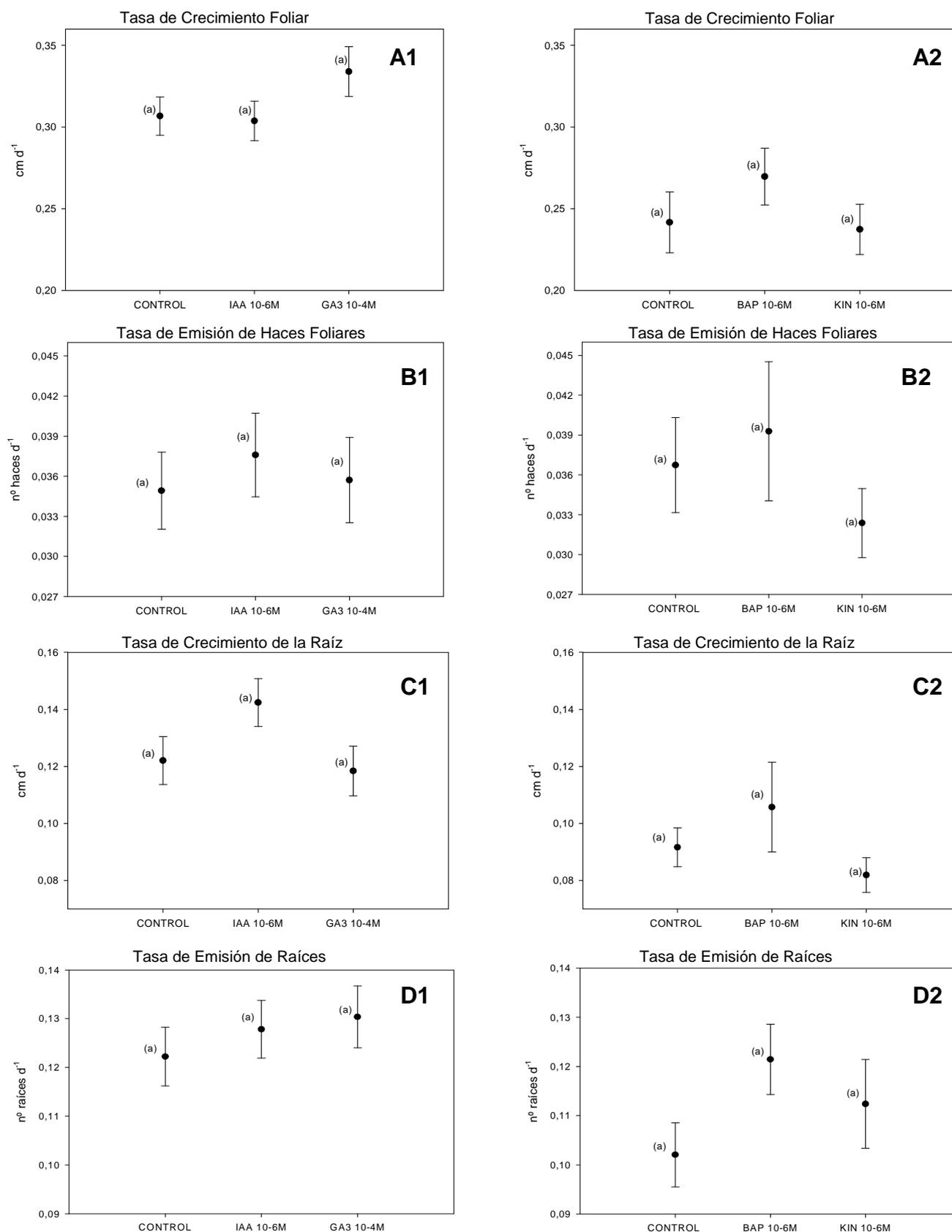


Fig. II.8. Tasas de crecimiento entre el día 20 (t_0) y 50 (t_2) de las plántulas sin el ápice del cotiledón tras inmersión con hormonas día 20 (t_0) y día 45 (t_1), en dos tandas de experimentos ($n = 20$ en cada experiencia). Distinta letra entre paréntesis hace referencia a diferencias significativas ($p < 0.05$). **A1-A2.** Tasa Crecimiento Foliar (cm d⁻¹). **B1-B2.** Tasa Emisión Haces (nº haces d⁻¹). **C1-C2.** Tasa Crecimiento Raíz (cm d⁻¹). **D1-D2.** Tasa Emisión Raíces (nº raíces d⁻¹).

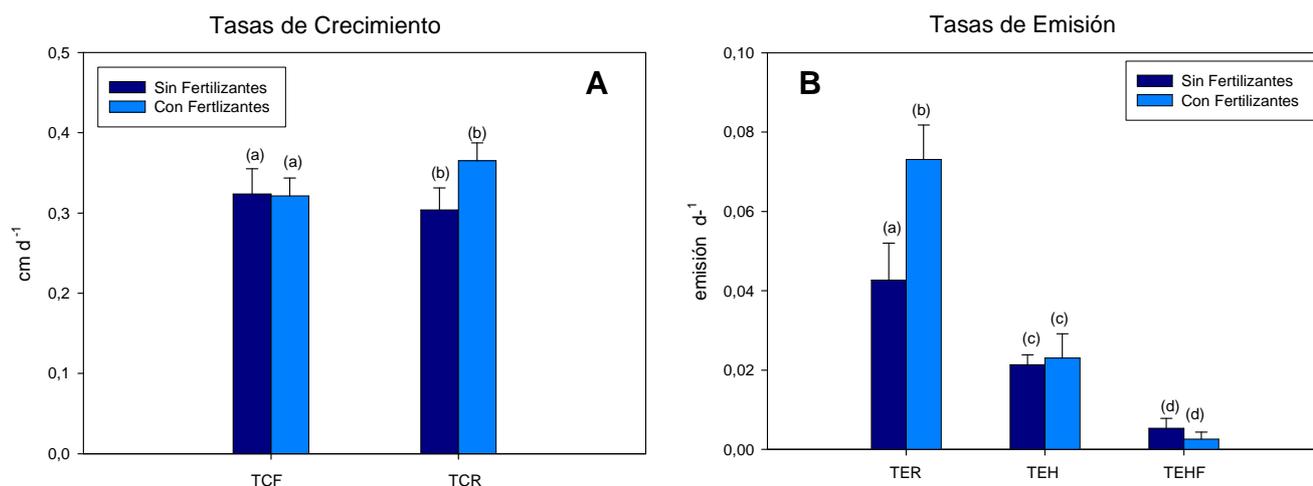


Fig. II.9. **A.** Tasas de crecimiento (cm d^{-1}) de las plántulas aclimatadas durante 30 días con o sin fertilizantes ($n = 30$ en cada experiencia), sin tener en cuenta la distancia a las barritas. TCF: Tasa Crecimiento Foliar; TCR: Tasa Crecimiento Radicular. **B.** Tasas de emisión de las plántulas aclimatadas durante 30 días con o sin fertilizantes ($n = 30$, en cada experiencia), sin tener en cuenta la distancia a las barritas. TER: Tasa Emisión Raíces (n° raíces d^{-1}); TEH: Tasa Emisión Hojas (n° hojas d^{-1}); TEHF: Tasa Emisión Haces Foliar (n^o haces foliares d^{-1}). Distinta letra entre paréntesis hace referencia a diferencias significativas ($p < 0.05$).

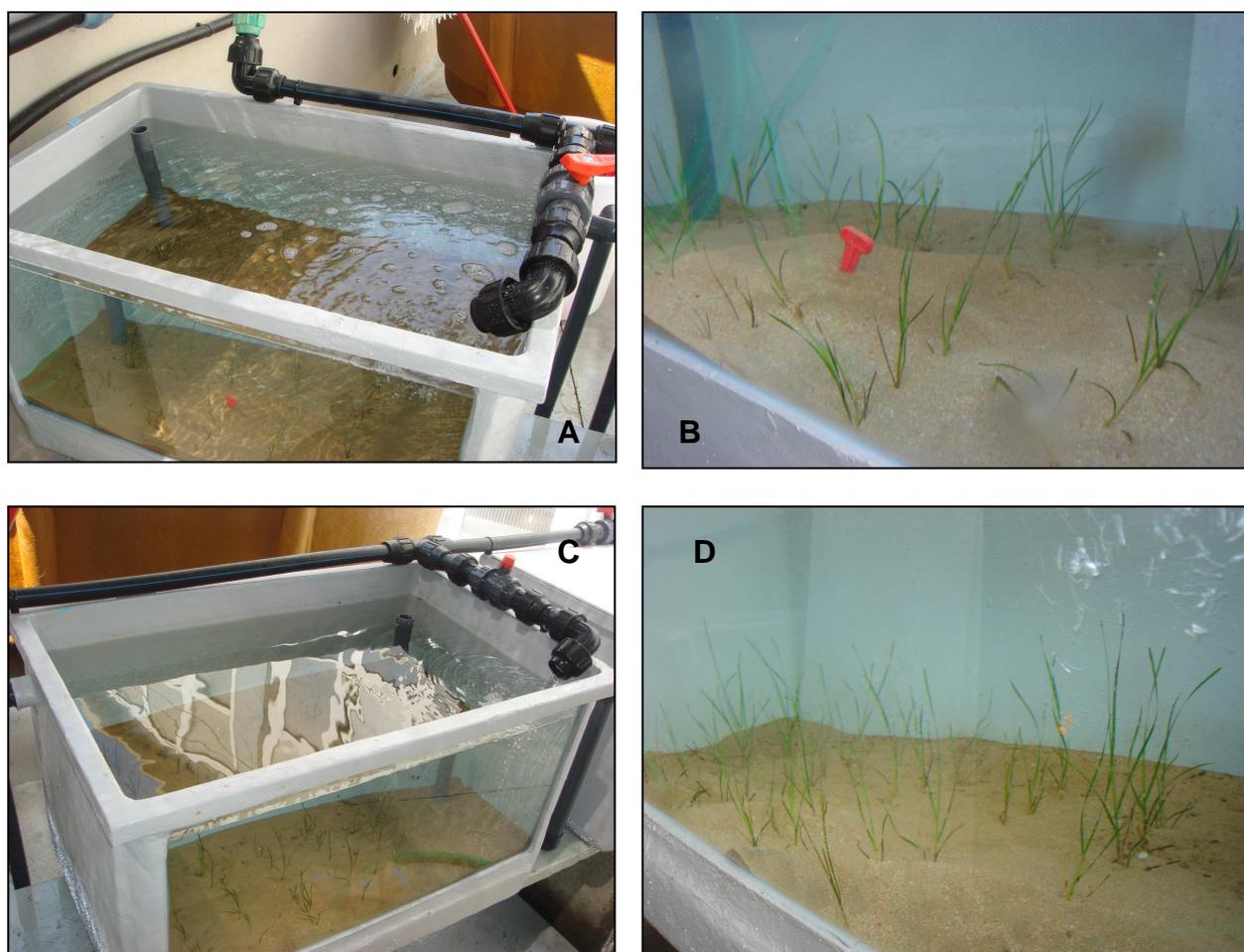


Fig. II.10. **A-B.** Plántulas aclimatadas en acuarios durante 8 días sin fertilizantes. **C-D.** Plántulas aclimatadas en acuarios durante 8 días con fertilizantes.

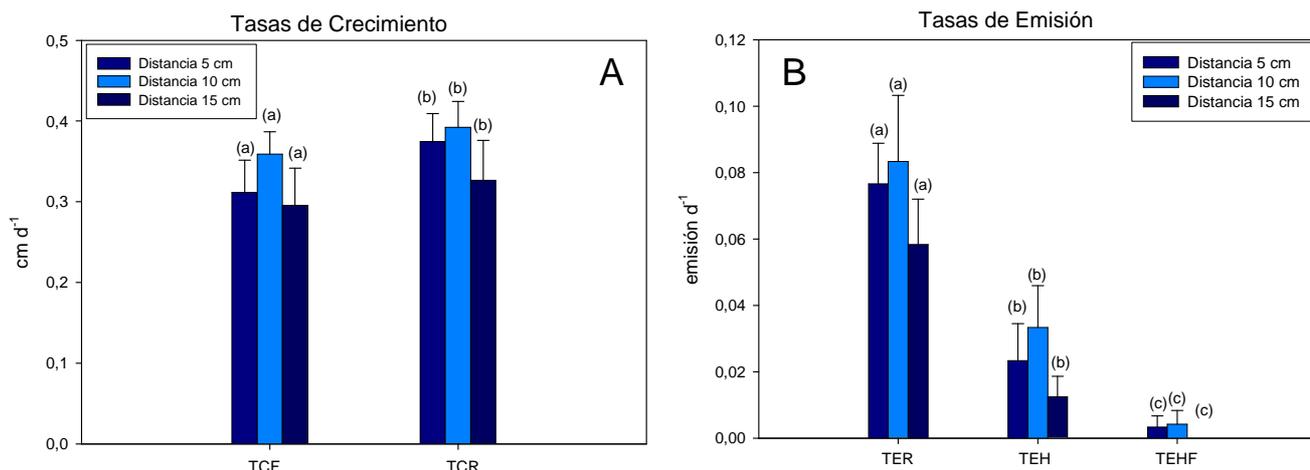


Fig. II.11. **A.** Tasas de crecimiento (cm d^{-1}) de las plántulas aclimatadas durante 30 días con fertilizantes a una distancia de 5, 10 y 15 cm de las barras de nutrientes; $n = 10$ en cada experiencia. TCF: Tasa Crecimiento Foliar; TCR: Tasa Crecimiento Radicular. **B.** Tasas de Emisión de las plántulas aclimatadas durante 30 días con fertilizantes a una distancia de 5, 10 y 15 cm de las barras de nutrientes; $n = 10$ en cada experiencia. TER: Tasa Emisión Raíces (n° raíces d^{-1}); TEH: Tasa Emisión Hojas (n° hojas d^{-1}); TEHF: Tasa Emisión Haces (n° haces foliares d^{-1}). Distinta letra entre paréntesis hace referencia a diferencias significativas ($p < 0.05$)

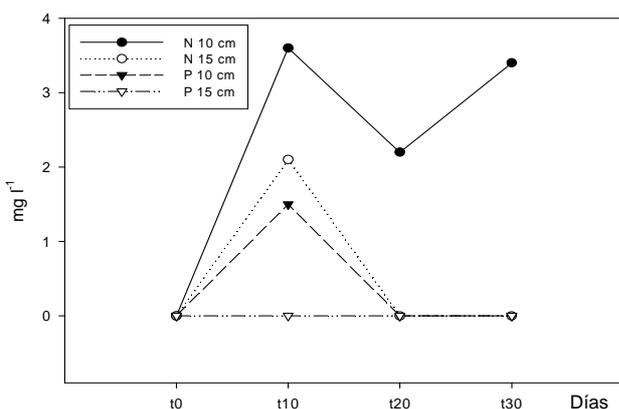


Fig. II.12. Concentración de fósforo y nitrógeno en el sedimento (mg l^{-1}), a lo largo de 30 días de estudio, y a distancias de 10 y 15 cm de las barras fertilizantes.

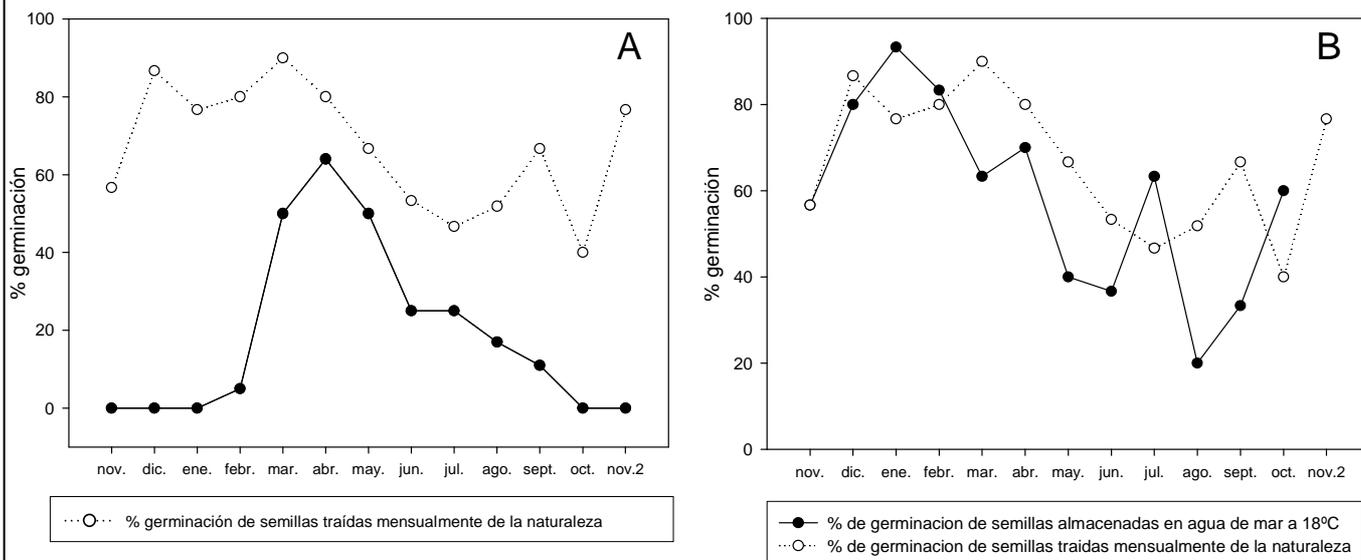
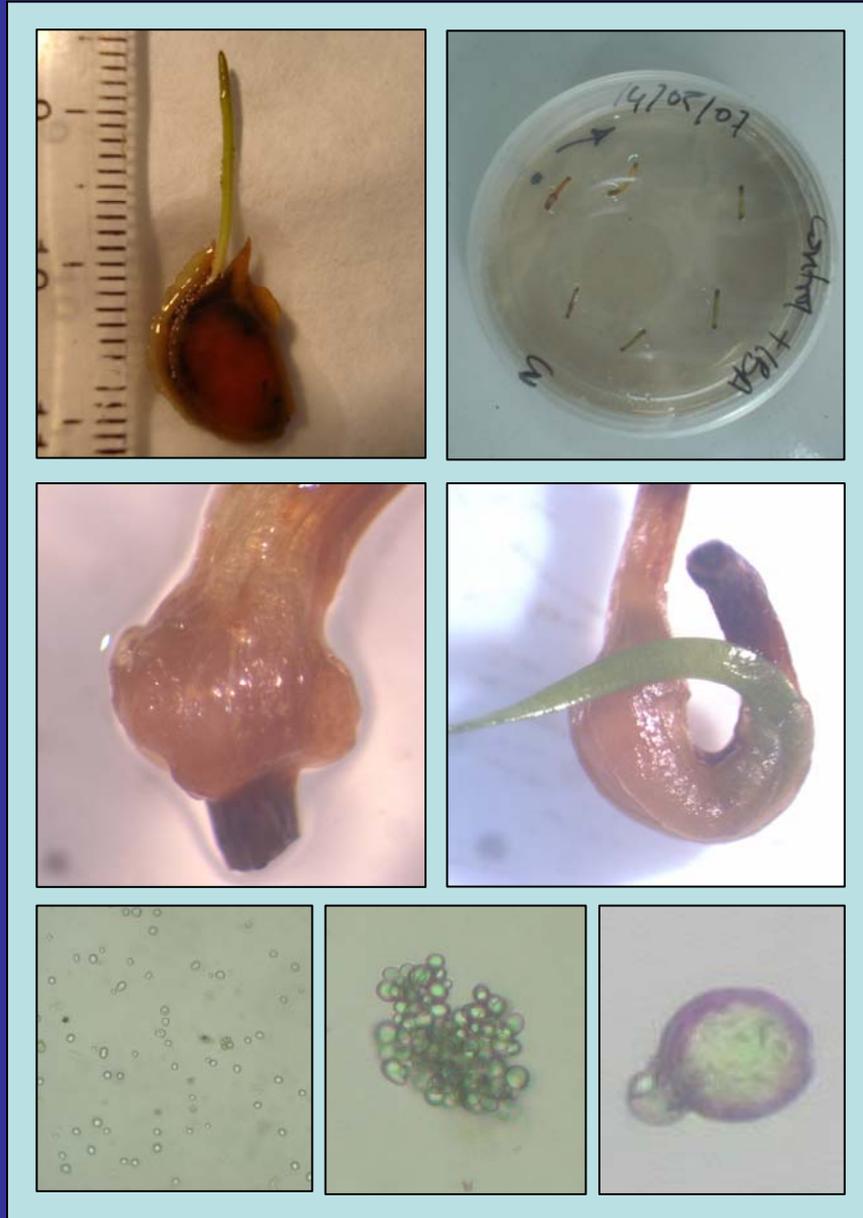


Fig. II.13. **A.** Porcentaje de germinación de semillas recolectadas mensualmente de la naturaleza. Para comparar se incluyen el número de plántulas o semillas germinadas m^{-2} halladas por Reyes & Sansón (1994) en una pradera del sur de Tenerife (●). **B.** Porcentaje de germinación de semillas almacenadas a 18°C y de semillas recolectadas mensualmente de la naturaleza.

CAPITULO III

Cultivo in vitro de Cymodocea nodosa a partir de tejido embrionario.

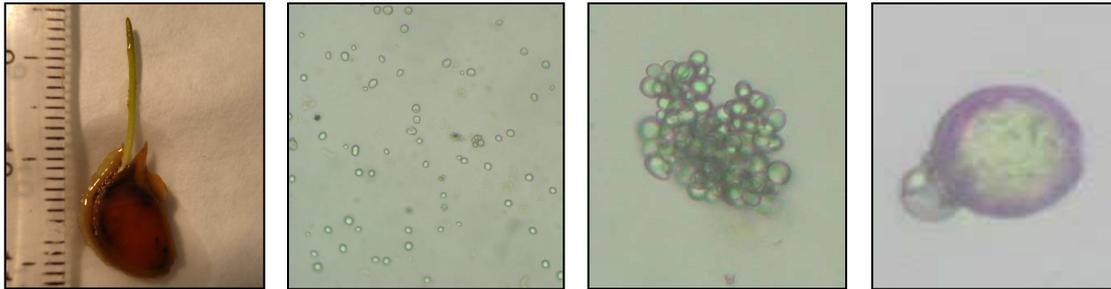


“ In vitro culture of seagrasses? Definitely impossible”
(Meinesz, 2008).

III. 1	Introducción Capítulo III.....	197
III.1.1.	El cultivo <i>in vitro</i> de tejidos.....	197
III.1.2.	La regulación de la respuesta <i>in vitro</i>	205
III.1.3.	Vías morfogénicas para la regeneración de plantas <i>in vitro</i> :	
	a) Embriogénesis Somática.....	211
	b) Organogénesis.....	216
III.1.4.	El cultivo <i>in vitro</i> en fanerógamas marinas.....	218
III. 2	Objetivos Capítulo III.....	221
III. 3	Material y Métodos Capítulo III.....	222
III.3.1.	Inducción de respuestas morfogénicas <i>in vitro</i> sobre explantos embrionarios.....	222
	III.3.1.1. Medio de cultivo PES y reguladores de crecimiento.....	222
	III.3.1.2. Medio de cultivo MS y técnica <i>Thin Cell Layer</i>	227
	III.3.1.3. Medio de cultivo MS y eliminación del <i>browning</i>	230
III.3.2.	Inducción de respuestas morfogénicas <i>in vitro</i> a partir del cultivo celular.....	232
III. 4	Resultados Capítulo III.....	235
III.4.1.	Inducción de respuestas morfogénicas <i>in vitro</i> sobre explantos embrionarios.....	235
	III.4.1.1. Medio de cultivo PES y reguladores de crecimiento.....	235

III.4.1.2. Medio de cultivo MS y técnica <i>Thin Cell Layer</i>	239
III.4.1.3. Medio de cultivo MS y eliminación del <i>browning</i>	239
III.4.2. Inducción de respuestas morfológicas <i>in vitro</i> a partir del cultivo celular.....	241
III. 5 Discusión Capítulo III.....	242
III.5.1. Importancia del tipo de explanto en la inducción de respuestas organogénicas (abultamientos/hojas).....	242
III.5.2. Imposibilidad de modificar el patrón de crecimiento del explanto a pesar del empleo de dos medios de cultivo (PES y MS).....	245
III.5.3. Las diferentes hormonas y concentraciones empleadas tampoco afectan a la respuesta final del explanto.....	247
III.5.4. Problemas asociados al cultivo: el <i>browning</i> y la contaminación.....	249
III.5.5. Inducción y mantenimiento de los cultivos celulares.....	252
III. 6 Conclusión Capítulo III.....	255
III. 7 Bibliografía Capítulo III.....	256
III. 8 Anexo Capítulo III. Figuras.....	270

III.1. INTRODUCCIÓN CAPÍTULO III



III.1.1. *El cultivo in vitro de tejidos posibilita la obtención de gran cantidad de material vegetal mediante la aplicación de distintas técnicas de propagación clonal.*

La historia del cultivo *in vitro* se remonta a principios del siglo XX cuando Haberlandt, en 1902, propuso la teoría de que todas las células vegetales tienen la capacidad de formar plantas completas sin importar el grado de diferenciación alcanzado por la célula (Litz & Jarret, 1991). Para desarrollar esta capacidad son necesarias condiciones específicas relacionadas con el medio de cultivo, la temperatura, el fotoperiodo y los reguladores de crecimiento entre otros. Esta capacidad exclusiva de los vegetales se denomina **totipotencia celular**.

Así, de forma general, **el cultivo de tejidos *in vitro*** puede definirse como un conjunto muy heterogéneo de técnicas que presentan en común el hecho de que un explanto (una parte separada del vegetal que pueden ser tejidos, órganos o sus células liberadas) se cultiva asépticamente en un medio artificial de composición química definida (Mroginski *et al.*, 2004). Los explantos se incuban en condiciones ambientales controladas con el fin de obtener plantas completas de manera rápida y a gran escala, para la reimplantación en su entorno o simplemente para llevar a cabo estudios de fisiología, genética o bioquímica, de cara a la transformación y mejora genética de los cultivos, la producción *in vitro* de metabolitos (como lípidos y proteínas), la selección de genotipos resistentes, etc... (Jiménez, 2001).

El explanto es un fragmento de órgano o tejido que se separa de la planta para iniciar el cultivo. La elección de un explanto apropiado constituye el primer paso para el establecimiento de los cultivos (Mroginski & Roca, 1991). Entre los más frecuentemente empleados están los ápices o meristemas caulinares, hojas, entrenudos, cotiledones, raíces, anteras, óvulos, inflorescencias, semillas y embriones. El empleo de embriones inmaduros y tejido de inflorescencias jóvenes es muy común para iniciar el cultivo de callos embriogénicos (una forma de crecimiento desorganizada que puede originar embriones, como explicaremos más adelante), capaces de regenerar plantas en numerosas especies terrestres, como pueden ser *Musa* spp. (Khalil *et al.*, 2002), *Zea mays* (Shohael *et al.*, 2003), *Saccharum* sp. (Tapia *et al.*, 1999), *Psidium guajava* (Vilchez *et al.*, 2002), *Cynodon dactylon* x *Cynodon transvaalensis* (Li & Qu., 2002), *Mangifera indica* (Pateña *et al.*, 2002) o *Secale cereale* (Ma & Pulli, 2004), entre muchas otras.

En otras especies, el empleo de estas inflorescencias o embriones inmaduros da como resultado la formación de embriones somáticos directamente del explanto (embriones iniciados a partir de células que no son producto de la fusión de gametos, ver explicación más adelante), como ocurre con algunas especies como *Paspalum scrobiculatum* (Vikrant & Rashid, 2001), *Saccharum* spp. (Desai *et al.*, 2004), *Triticum durum* (Fernandez *et al.*, 1999; Eudes *et al.*, 2003), *Oryza* sp. (Sahasrabudhe *et al.*, 2000, Mariani *et al.*, 2000), *Arachis hypogaea* (Radhakrishnan *et al.*, 2001), *Mangifera indica* (Pliego-Alfaro *et al.*, 1996; Xiao *et al.*, 2004), *Pinus pinaster* (Miguel *et al.*, 2004), *Pinus bungeana* (Zhang *et al.*, 2007), *Picea abies* (Ramarosandratana & Staden, 2004), *Hordeum vulgare*, *Triticum aestivum*, *T. monococcum*, *T. urartu*, *Secale cereale* y *Avena sativa* (Eudes *et al.*, 2003), entre otras.

En otras ocasiones, se han empleado embriones y semillas maduras para producir callos embriogénicos, como en las especies *Paspalum notatum* (Grando *et al.*, 2002), *Paspalum scrobiculatum* (Vikrant & Rashid, 2002, 2003), *Triticum aestivum* (Turhan & Baser, 2004, Mendoza & Kaeppler, 2002), *Gossypium hirsutum* (Wu *et al.*, 2004, Sakhanokho *et al.*, 2005) o *Coffea canephora* (Kumar *et al.*, 2007). El empleo de embriones maduros también ha conducido a la formación directa de embriones somáticos en especies como *Arachis hypogaea* (Venkatachalam *et al.*, 1999, Little *et al.*, 2000), *Hyoscyamus niger* (Tu *et al.*, 2005) o *Vigna radiata* (Kaviraj *et al.*, 2006), entre otras.

Los callos, obtenidos del cultivo de estos diferentes explantos, consisten en masas de células desorganizadas, que crecen y se dividen. Cuando los callos son friables, las células están sólo ligeramente asociadas, y pueden disgregarse con facilidad, lo que permite obtener células que sirven como explantos para **el cultivo celular**. Cuando un callo friable se coloca en un medio líquido y agitado, las células aisladas o pequeños agregados celulares se sueltan al medio. Bajo condiciones adecuadas, estas células continúan creciendo y dividiéndose, produciendo un cultivo de células en suspensión. Pueden cultivarse las células repetidamente en medio fresco diluyendo las suspensiones e iniciando un nuevo ciclo de crecimiento (Slater *et al.*, 2003). Estas células sirven como punto de partida para la regeneración de plantas enteras, a partir de organogénesis o embriogénesis somática (Patnaik *et al.*, 1997; Yong-Eui *et al.*, 1999; Vengadesan *et al.*, 2002; Varisai Mohamed *et al.*, 2004). También a partir de estas células en suspensión o de otras células del mesófilo, se pueden obtener

protoplastos, células vegetales a las que se ha retirado la pared celular por digestión enzimática y están rodeadas sólo por la membrana plasmática. Los protoplastos son frágiles y se dañan fácilmente, por lo que deben de ser cultivados con cuidado; en consecuencia, el medio líquido no se agita y debe mantenerse con un alto potencial osmótico al menos en las primeras fases. Los protoplastos cultivados en medio sólido pueden producir callos (Slater *et al.*, 2003). Debido a la ausencia de pared celular, los protoplastos son adecuados para diversas manipulaciones genéticas, que no serían posibles con plantas o células intactas. Muchos protoplastos pueden resintetizar la pared celular, dividirse, formar colonias y regenerar igualmente plantas a partir de embriogénesis u organogénesis (Abdullah *et al.*, 1986). En definitiva, los protoplastos sirven como herramienta única para muchas investigaciones fisiológicas, biofísicas y bioquímicas.

Algunos tipos de explantos pueden emplearse para disminuir la posibilidad de contaminación por microorganismos. Éstos provienen de plantas jóvenes libres de patógenos que crecen en invernaderos o explantos provenientes de semillas germinadas en condiciones asépticas (Mroginski & Roca, 1991). El cultivo de meristemas también facilita la eliminación de patógenos, ya que son zonas que no están vascularizadas (muchos patógenos se traslocan por los tejidos de conducción), siendo el número de partículas virales menor que en otros tejidos. Si lo que se busca es la obtención de plantas con sanidad controlada, es muy común la utilización de meristemas consistentes en el domo y un par de primordios foliares (Mroginski *et al.*, 2004).

El potencial organogenético de un explanto es inversamente proporcional a su edad fisiológica, es decir, cuanto más joven e indiferenciado es un explanto, mejor será su respuesta *in vitro* (Litz & Jarret, 1991). Es el caso de la micropropagación de plantas leñosas, donde la edad del explanto es un factor crítico (Mroginski *et al.*, 2004) y la regeneración de las plantas requiere de la utilización de explantos provenientes de materiales juveniles (Pullman *et al.*, 2003b, 2005; Ramarosandratana & Staden, 2004; Miguel *et al.*, 2004; Zhang *et al.*, 2007). En *Mangifera indica*, por ejemplo, sólo los cotiledones inmaduros pudieron emplearse satisfactoriamente en la inducción de embriones somáticos (Xiao *et al.*, 2004). En otras especies, la etapa de desarrollo del embrión cigótico es también un factor determinante, como en el caso de *Psidium guajava*, donde sólo los embriones cigóticos en etapa de torpedo y cotiledonal llegaron a formar embriones somáticos; mientras, el empleo de embriones en las primeras etapas

de desarrollo (globular y corazón) no resultaron en la inducción de respuestas embriogénicas (Vilchez *et al.*, 2002). En la especie *Oryza* sp. (Mariani *et al.*, 2000), sólo los embriones inmaduros (14-17 días después de la antesis) produjeron embriones somáticos capaces de germinar. También en la especie *Secale cereale* el estado de desarrollo de los embriones fue un factor determinante en la inducción (Ma & Pulli, 2004).

Por último, el tamaño del explanto puede igualmente determinar la respuesta *in vitro* (Litz & Jarret, 1991). En general cuanto más grande sea el explanto, mayores serán las posibilidades de inducir la proliferación de callos o la regeneración directa de órganos. Sin embargo, a mayor tamaño se incrementan también las posibilidades de que los cultivos se contaminen con microorganismos. Es necesario, además, tener en cuenta que existe un tamaño mínimo del explanto, que depende de la especie y del material vegetal, por debajo del cual no es fácil lograr el establecimiento de los cultivos (Mroginski *et al.*, 2004). Sin embargo, se ha usado exitosamente una técnica desarrollada por Tran Thanh Van (Nhut *et al.*, 2003), consistente en emplear delgadas capas de células (0.2-0.4 mm) (*Thin Cell Layer*) como punto de partida para inducir embriogénesis somática u organogénesis en diferentes especies monocotiledóneas, como *Digitaria sanguinalis* (Bui *et al.*, 1998), *Sorghum bicolor* (Gendy *et al.*, 1996) o *Lilium longiflorum* (Bui *et al.*, 1999).

El medio de cultivo empleado en el cultivo de tejidos *in vitro* puede ser definido como una formulación de sales inorgánicas y compuestos orgánicos requeridos para la nutrición y manipulación de los cultivos (Mroginski *et al.*, 2004). Existen numerosas formulaciones, entre las más empleadas están los medios desarrollados por Murashige & Skoog (1962), White (1963), Gamborg *et al.* (1968), Linsmaier and Skoog (1965), Schenk *et al.* (1972), Heller (1953), Muller & Grafe (1978) o Chu *et al.* (1975). La composición general de un medio de cultivo consta de:

1. Componentes inorgánicos

- a) Macronutrientes

Son los elementos necesarios para el crecimiento y desarrollo de la planta en grandes cantidades. Los macronutrientes que se añaden al medio de cultivo son normalmente el nitrógeno (NO_3^-), el fósforo (PO_4^{3-}), el potasio (K^+), el magnesio (Mg^{2+}), el calcio (Ca^{2+}), el azufre (SO_4^{2-}), y el carbono, que se añade separadamente.

Estos elementos normalmente comprenden el 0.1% del peso seco de las plantas (Slater *et al.*, 2003). Cada elemento es indispensable debido a que tienen una función específica en el crecimiento y nutrición de las plantas:

El Nitrógeno. Es un componente de las proteínas, ácidos nucleicos y algunas coenzimas, además de ser un factor clave en la inducción y maduración de embriones somáticos. Por ejemplo, en el trabajo llevado a cabo por Wu *et al.*, (2004) con la especie *Gossypium hirsutum*, cuando la concentración de N se duplicaba, los callos producían embriones más rápido y con mayor frecuencia. El nitrógeno es un elemento requerido en grandes cantidades, y se añade normalmente como mezcla de ión nitrato (a partir del KNO_3) e iones amonio (a partir de NH_4NO_3) (Slater *et al.*, 2003). Teóricamente, hay una ventaja en el nitrógeno añadido en forma de iones amonio frente al nitrato. Ésta se debe a que la incorporación del nitrógeno debe ocurrir en forma reducida para ser incorporado a las macromoléculas, por lo que los iones nitrato necesitan ser reducidos previamente. Sin embargo, en altas concentraciones, el ión amonio puede ser tóxico para el cultivo celular, ya que la toma de iones amonio puede causar la acidificación del medio. Con el fin de usar iones amonio como única fuente de nitrógeno, el medio necesita ser tamponado. Altas concentraciones de iones amonio pueden causar también problemas en el cultivo por aumentar la frecuencia de vitrificación. Usando una mezcla de iones nitratos y amonio se tiene la ventaja de tamponar ligeramente el medio ya que la asimilación de los primeros provoca la excreción de iones OH^- (Slater *et al.*, 2003).

El Fósforo. Es un componente de los ácidos nucleicos y de los intermediarios en la respiración y la fotosíntesis, y además, transfiere la energía necesaria para muchos procesos metabólicos. Por otro lado, altas concentraciones de fosfatos pueden conducir a la precipitación de elementos del medio en fosfatos insolubles.

El Potasio. Es un cofactor enzimático y regula el potencial osmótico del medio.

El Magnesio. Tiene un papel estructural como componente de la molécula de clorofila. Es requerido para mantener la integridad de los ribosomas y la estabilidad estructural de los ácidos nucleicos y de las membranas (Hernández Gil, 2002).

El Calcio. Tiene la función de impedir daños a la membrana celular y mantener su integridad. Se piensa que el calcio actúa como un regulador de la división y extensión celular, y modula la acción de todas las hormonas vegetales, regulando la germinación, el crecimiento y senescencia (Hernández Gil, 2002).

El Azufre. Es componente de algunos aminoácidos (metionina, cisteína), pudiendo actuar como cofactor en muchas reacciones enzimáticas (Slater *et al.*, 2003).

b) Micronutrientes

Estos elementos son necesarios en cantidades trazas, pero son igualmente importantes para el crecimiento y desarrollo de las plantas. Los micronutrientes que se añaden normalmente al medio de cultivo son el manganeso (Mn^{2+}), el yodo (I), el cobre (Cu^{2+}), el cobalto (Co^{2+}), el boro (B^{3+}), el molibdeno (Mo^{2+}), el hierro (Fe^{2+}) y el zinc (Zn^{+}). Algunos otros elementos como el níquel (Ni^{2+}) y el aluminio (Al^{3+}) son también frecuentes en algunas formulaciones de medios de cultivo (Slater *et al.*, 2003). Al igual que los macronutrientes, los micronutrientes tienen diversas funciones específicas en el crecimiento y desarrollo de las plantas.

El Manganeso. Es un cofactor enzimático y es un microelemento esencial para la síntesis de clorofila. Su función principal está relacionada con la activación de enzimas como la arginasa y fosfotransferasas. Participa en el funcionamiento del fotosistema II, responsable de la fotólisis del agua (Hernández Gil, 2002).

El Cobre. Es un cofactor enzimático y participa en las reacciones de transferencia de electrones.

El Cobalto. Es un componente de algunas vitaminas.

El Molibdeno. Es un cofactor enzimático y forma parte de la nitrato reductasa, la cual cataliza la reducción del ión nitrato (NO_3) a ión nitrito (NO_2). Las plantas superiores pueden crecer en ausencia de molibdeno si se les suministra el nitrógeno en la forma de ión amonio (NH_4) (Hernández Gil, 2002).

El Cloro. Es un elemento esencial para la fotosíntesis. Además, es un regulador de la presión osmótica y produce el balance de los cationes en la savia celular de las células vegetales.

El Hierro. Participa en la transferencia de electrones como componente del citocromo. Además forma parte de las proteínas y participa en reacciones de óxido-reducción. En las hojas casi todo el hierro se encuentra en los cloroplastos, donde juega un papel importante en la síntesis de proteínas cloroplásticas. También forma parte de una gran cantidad de enzimas respiratorias, como la peroxidasa, catalasa, ferredoxina y citocromo-oxidasa (Hernández Gil, 2002). El hierro es también esencial para la embriogénesis somática ya que en ausencia de este elemento, los embriones somáticos globulares no son capaces de desarrollarse hasta la madurez (Litz & Jarret, 1991). El hierro se añade normalmente como sulfato de hierro, el cual se usa en conjunción con el EDTA (ácido etilen-diaminetetracético), formando así un complejo que permite la liberación del hierro al medio de forma lenta y continuada (Slater *et al.*, 2003).

El Zinc. Es un cofactor enzimático, esencial para la actividad, la regulación y la estabilización de la estructura proteica o una combinación de éstas. Es necesario para la biosíntesis de clorofila (Slater *et al.*, 2003).

El Boro. El boro es requerido por las plantas superiores y algunas algas, pero su función no está claramente identificada. Se ha sugerido que el boro puede jugar un papel importante en la síntesis de pirimidinas y flavonoides, así como en el transporte de azúcares a través del floema bajo la forma de complejos tipo boratos. El boro estaría implicado junto al calcio en el metabolismo de la pared celular. Se ha encontrado que una relación constante de calcio y boro debe ser óptima para el crecimiento vegetal (Hernández Gil, 2002).

El Níquel. El níquel forma parte de la metaloenzima ureasa, la cual descompone la urea en amoníaco y dióxido de carbono. Resulta entonces esencial para las plantas que se abonan con urea o con sus derivados, jugando un papel importante en el metabolismo nitrogenado (Hernández Gil, 2002).

2. Componentes orgánicos

Carbohidratos. Muy pocos cultivos *in vitro* son autótrofos estrictos, y por lo tanto es necesario agregar al medio una fuente de carbono. La sacarosa (2-5%) es la más comúnmente utilizada; se emplean además glucosa, maltosa, galactosa, sorbitol y mio-inositol. En las monocotiledóneas, altas concentraciones de sacarosa proveen el ímpetu necesario para el crecimiento del embrión, conduciendo a su germinación y a la formación de plántulas (Godbole *et al.*, 2002). Además, el tipo de carbohidrato empleado puede influir en la inducción de la embriogénesis somática. Así, en la especie *Secale cereale* la embriogénesis somática se vio favorecida por el empleo de sacarosa en relación a maltosa y glucosa (Ma & Pulli, 2004). Igualmente, el suministro de carbohidratos durante la maduración, determina el número y la calidad de los embriones somáticos formados, siendo la sacarosa (3-6%) la más frecuentemente empleada en esta fase de desarrollo (Tapia *et al.*, 1999; Zhang *et al.*, 2007). Esto se observó en varias especies de coníferas, como *Picea mariana* y *Picea glauca*, donde un medio de maduración de embriones somáticos con un 6% sacarosa, la cual se hidrolizaba a glucosa y fructosa, dio un mayor número de embriones que un medio con 3.16% de glucosa y fructosa (Iraqi & Tremblay, 2001). Estos autores sugirieron en la conclusión de su trabajo que la sacarosa en el medio de maduración no sólo sirve como fuente de

carbono, energía y osmótico, sino que, además, actúa como factor de regulación en la maduración de los embriones somáticos de ambas especies. En este contexto, la presencia de sacarosa seguida de su hidrólisis debe de servir como señal en la síntesis de proteínas de almacenamiento, lo que provoca un aumento en la calidad y germinabilidad de los embriones somáticos.

Vitaminas. Las plantas verdes se consideran autótrofas para las vitaminas, pero puede ser necesario añadirlas al medio hasta que los cultivos crezcan o se hayan vuelto verdes. En la mayoría de los medios, la tiamina, la biotina, la piridoxina y el ácido nicotínico se consideran beneficiosas y se añaden de forma rutinaria (Krikorian, 1991).

Aminoácidos. Los aminoácidos son también comúnmente incluidos como suplementos orgánicos. El más usado es la glicina. La tirosina, la arginina, la asparagina, la cisteína, la alanina, la fenilalanina, la glutamina, la prolina y los ácidos aspártico y glutámico son también empleados (Slater *et al.*, 2003). De los aminoácidos, únicamente son activos las formas L, y la presencia de las formas D puede contrarrestar los efectos beneficiosos de las primeras. Se ha demostrado que los aminoácidos son eficientes para inducir tanto la organogénesis como la embriogénesis somática y el desarrollo de los embriones (Miguel *et al.*, 2004; Wu *et al.*, 2004 y referencias internas). Por ejemplo, en la especie *Gossypium hirsutum*, la conversión de los embriones a plántulas fue menor en ausencia de L-asparagina y L-glutamina (Wu *et al.*, 2004).

Caseína hidrolizada. Es usada en ocasiones como un cóctel de aminoácidos. En muchos trabajos es frecuente la adición de esta sustancia en los medios de inducción de embriogénesis somática en concentraciones que suelen variar entre 0.1 y 1.5 g l⁻¹ (por ejemplo: Ipekci & Gozukirmizi, 2003 con *Paulownia elongata*; Mariani *et al.*, 2000 con *Oryza sativa*; Sata *et al.*, 2000 con *Allium sativum*; Shohael *et al.*, 2003 con *Zea mays*; Iraqi and Tremblay, 2001 con *Picea mariana* y *Picea glauca*; Zhang *et al.*, 2007 con *Pinus bungeana*). En algunos trabajos se ha demostrado que la adición de esta sustancia acompañada de L-glutamina incrementa significativamente el número de embriones cigóticos que producen embriones somáticos (Miguel *et al.*, 2004, con *Pinus pinaster*).

Agua de coco (AC). Se emplea también en ciertas ocasiones ya que se trata de un medio muy complejo, con una amplia gama de componentes orgánicos e inorgánicos, que ha reportado grandes avances en el cultivo de tejidos de diferentes especies (Krikorian, 1991).

Carbón activo (entre 0.1 y 5%). Puede ser incorporado al medio para que absorba metabolitos tóxicos para los cultivos, previniendo el *browning* o

ennegrecimiento de los explantos (Loskutov *et al.*, 1999). Además se cree que puede prevenir el crecimiento de callo no deseado y promocionar la morfogénesis, en particular la embriogénesis y el crecimiento de raíces (Vikrant & Rashid, 2001). Otros autores han reportado que, además de reducir el *browning* y de aumentar el crecimiento de las raíces, aumenta el crecimiento de los haces y el peso fresco de la planta entera (Sarma & Rogers, 2000 y referencias que se citan en este artículo).

Agentes gelificantes. Son sustancias empleadas para solidificar los medios de cultivo *in vitro*. Entre ellas, la más empleada es el agar, con concentraciones que varían entre 0,5 y 1%, pero también son frecuentes el gelrite, la agarosa y el phytigel. Hay estudios que demuestran que la respuesta *in vitro* de los cultivos depende de la sustancia gelificante empleada, y no siempre es el agar la más beneficiosa. En el trabajo de Bui *et al.*, (1999) con la especie *Lilium longiflorum*, la formación de plantas fue 6 veces superior con gelrite que con agar y 30 veces superior con gelrite que con agarosa. Ma & Pulli (2004) también observaron que la embriogénesis somática en *Secale cereale* estaba afectada por el agente gelificante, siendo en este caso mejor el phytigel que el agar. En otros trabajos, el medio líquido o una capa líquida sobre el medio sólido estimulaban la iniciación del tejido embriogénico (Pullman & Skryabina, 2007, con *Pinus taeda*).

III.1.2. La respuesta *in vitro* es regulada por sustancias químicas, naturales y sintéticas, denominadas hormonas o sustancias reguladoras del crecimiento.

Como ya vimos en el Capítulo II, se conocen cinco grupos principales de hormonas vegetales o fitohormonas: las auxinas, las citoquininas, las giberelinas, el etileno y el ácido abscísico, además de otras sustancias que también pueden clasificarse como tales: las poliaminas, los brasinosteroides, el ácido salicílico, los jasmonatos, las oligosacarinas y el óxido nítrico, entre otros. Estas sustancias son empleadas en el cultivo de tejidos para inducir respuestas morfogenéticas *in vitro*.

La presencia de auxinas en el medio de cultivo, especialmente de la auxina sintética **2,4-D**, es el factor que determina la inducción de embriogénesis somática en una gran mayoría de especies, por ejemplo, en *Arachis hypogaea* (Cucco & Rossi-Jaume, 2000), *Oryza* sp. (Mariani *et al.*, 2000), *Paspalum scrobiculatum* (Vikrant & Rashid, 2001, 2003), *Acca sellowiana* (Cangahuala-inocente *et al.*, 2007), *Macrotyloma uniflorum* (Varisai Mohamed *et al.*, 2004), *Mangifera indica* (Pliego-Alfaro *et al.*,

1996), *Cocos nucifera* (Azpeitia *et al.*, 2003), *Manihot esculenta* (Medina *et al.*, 2003), *Zea mays* (Shohael *et al.*, 2003), *Triticum durum* (Fernandez *et al.*, 1999), *Saccharum* sp (Tapia *et al.*, 1999), *Psidium guajava* (Vilchez *et al.*, 2002) o *Scirpus robustus* (Wang *et al.*, 2004). A pesar de la eficiencia del 2,4-D en la inducción de callo embriogénico, hay especies que reaccionan mejor con otras hormonas como es el caso de *Saccharum officinarum* (Marcano *et al.*, 2002) o *Secale cereale* (Ma & Pulli, 2004), que responden mejor al efecto de la hormona **dicamba** (ácido 3,6 dicloro-2metoxibenzoico). El **picloram** es la hormona empleada para inducir la embriogénesis somática en *Triticum aestivum* (Mendoza & Kaeppler, 2002) y *Arachis hypogaea* (Little *et al.*, 2000). En muchas ocasiones, la combinación de dos auxinas resulta en la inducción de la embriogénesis somática, como en *Arachis hypogaea* (Radhakrishnan *et al.*, 2001) y *Triticum aestivum* (Turhan & Baser, 2004) donde se emplean las auxinas NAA y **2,4-D**. En *Musa* spp., por ejemplo, es una combinación de 3 auxinas lo que induce la embriogénesis somática (**2,4-D**, IAA y NAA; Khalil *et al.*, 2002). Las auxinas **2,4-D** e IAA se emplean también para inducir la organogénesis indirecta en *Spartina alterniflora* (Wang *et al.*, 2003). Según Raemakers *et al.* (1995), la auxina más empleada en la inducción de embriogénesis somática es el 2,4-D (49%), seguida del NAA (27%), IAA (6%), IBA (6%), Picloram (5%) y Dicamba (5%). Y según Gaj (2004), el 65% de los protocolos recientes de embriogénesis somática emplean el 2,4-D sólo o en combinación con otros reguladores de crecimiento.

En ocasiones, la adición al medio de cultivo de una **citoquinina**, en vez de una auxina, lleva también a la inducción de embriogénesis somática, por ejemplo con **TDZ** en las especies *Paulownia elongata* (Ipekci & Gozukirmizi, 2003) y *Geranium* sp. (Qureshi & Saxena, 1992); con **BA** en las especies *Quassia amara* (Martin & Madassery, 2005), *Coffea arabica* y *Coffea canephora* (Giridhar *et al.*, 2004), o con una combinación de **TDZ** y **BAP** en *Medicago sativa* (Iantcheva *et al.*, 1999). Cuando las citoquininas son la única fuente de inducción de embriogénesis, la más empleada es la BAP (57%), seguida de la Kinetina (37%), Zeatina (3%) y TDZ (3%) (Raemakers *et al.*, 1995). Las citoquininas también estimulan otras respuestas morfogénicas; por ejemplo, la BA promueve la regeneración de haces a través de organogénesis en *Typha latifolia* (Rogers *et al.*, 1998) o *Juncus accuminatus* (Sarma & Rogers, 1998), y el TDZ en *Paspalum scrobiculatum* (Vikrant & Rashid, 2002).

Existe una dificultad considerable en predecir las respuestas de los cultivos a los reguladores de crecimiento, debido a las grandes diferencias que existen entre las diferentes especies. Sin embargo, hay algunos principios que son considerados como verdaderos, como es la ratio de auxinas y citoquininas, la cual determina el tipo de cultivo establecido o regenerado (Litz & Jarret, 1991). **La relación auxina/citoquinina regula la morfogénesis en cultivos de tejidos in vitro.** Así, una concentración más o menos igual de las dos hormonas, hace que las células se mantengan indiferenciadas, formando masas de tejido denominadas callos. Cuando la concentración de auxina es superior, el tejido indiferenciado se organiza formando raíces. Con una concentración superior de citoquinina se forman yemas. Y con un cuidadoso equilibrio de las dos hormonas se puede producir raíces y yemas, y por lo tanto, una plántula nueva. En muchas ocasiones la unión de una auxina y una citoquinina aumenta la frecuencia de embriogénesis somática, por ejemplo, la unión de **NAA** y **KIN** indujo la embriogénesis somática en *Vigna radiata* (Kaviraj *et al.*, 2006), *Gossypium hirsutum* (Sakhanokho *et al.*, 2005) y *Saccharum* spp. (Desai *et al.*, 2004). Las hormonas **2,4-D** y **KIN** aumentaron la embriogénesis somática en *Aesculus glabra* (Trick & Finer (1999), *Cymbopogon martinii* (Patnaik *et al.*, 1997) y *Allium sativum* (Sata *et al.*, 2000); **2,4-D** y **BAP** en *Oryza* sp. (Sahasrabudhe *et al.*, 2000), *Cynodon dactylon* x *Cynodon transvaalensis* (Li & Qu, 2002), *Acacia sinuata* (Vengadesan *et al.*, 2002), *Pinus pinaster* (Miguel *et al.*, 2004), *Digitaria sanguinalis* (Bui *et al.*, 1998), *Hordeum vulgare*, *Triticum aestivum*, *T. durum*, *T. monococcum*, *T. urartu*, *Secale cereale*, *Avena sativa* (Eudes *et al.*, 2003) y *Pinus bungeana* (Zhang *et al.*, 2007). **NAA** y **BA** en *Arachis hypogaea* (Venkatachalam *et al.*, 1999) y *Carthamus tinctorius* (Mandal & Gupta, 2002). **BA** e **IAA** en *Coffea arabica* y *Coffea canephora* (Giridhar *et al.*, 2004). **IBA** y **KIN** en *Gossypium hirsutum* (Wu *et al.*, 2004). **Dicamba** y **BA** en *Paspalum notatum* (Grando *et al.*, 2002); y las hormonas **NAA**, **BA** y **KIN** en *Echinochloa colona* (Samantaray *et al.*, 1997).

Se ha demostrado, por otra parte, que las **giberelinas** incrementan o reducen la embriogénesis somática en plantas dependiendo de la especie (Pullman *et al.*, 2005 y referencias internas). Es por ello que en ocasiones se han empleado inhibidores del ácido giberélico como inductores de la embriogénesis somática (por ejemplo: el paclobutrazol, flurprimidol, chlormequat-Cl, daminozide...). En ocasiones, la adición de GA₃ en el medio de regeneración ayudó a romper la dormancia de los embriones somáticos y aceleró su germinación (por ejemplo en *Cynodon dactylon*-*Cynodon*

transvaalensis, Li & Qu, 2002). Por otro lado, los inhibidores de GA₃ han mejorado la embriogénesis somática en diferentes especies como *Citrus* sp., *Echinocloa frumentacea*, *Nerine x Mansellii*, *Pelargonium* spp., *Asparagus officinales*, y varias especies de coníferas como *Pinus taeda*, *Pinus elliottii*, *Pseudotsuga menziesii* y *Picea abies* (Pullman *et al.*, 2005 y referencias internas).

El **ácido abscísico** (ABA) se usa frecuentemente en cultivo *in vitro* para promover distintos tipos de desarrollo, como la inducción y maduración de embriones somáticos. En el trabajo llevado a cabo por Li & Qu (2002), la adición de ABA en el medio de inducción aumentó la embriogénesis somática en *Cynodon dactylon x Cynodon transvaalensis*. Igualmente promovió la iniciación del tejido embriogénico en las especies *Pinus taeda* (Pullman *et al.*, 2003a), *Dactylis glomerata* (Bell *et al.*, 1993), o *Daucus carota* (Nishiwaki *et al.*, 2000). El ácido abscísico es considerado como un importante componente en los medios de maduración de embriones somáticos. Se cree que el ABA añadido al medio de maduración altera la biosíntesis de nucleótidos, el metabolismo del ácido ascórbico y del nitrógeno (acumulando ciertos aminoácidos y reduciendo los niveles de otros), y la síntesis de poliaminas (Stasolla & Yeung, 2003 y referencias internas). En ausencia de ABA la maduración es deficiente y el desarrollo de los embriones asincrónico, la morfología del embrión anormal y la germinación precoz. Con la adición de esta hormona en el medio de cultivo se logran embriones de alta calidad con una frecuencia de conversión en plantas mucho mayor. Las metodologías que llevan a la producción de embriones somáticos maduros y germinables generalmente implican un medio de maduración que contenga ABA y un osmótico. Ambos, ABA y osmótico, afectan a la acumulación de reservas, como proteínas de almacenamiento y triacilglicéridos (Stasolla & Yeung, 2003 y referencias internas). La maduración de los embriones somáticos de *Picea mariana* y *Picea glauca* (Iraqi & Tremblay, 2001) requirieron de la presencia de sacarosa y ABA; PEG (Polyethylene glycol, como osmótico) y ABA fueron necesarios para la maduración de los embriones en *Pinus taeda* (Li *et al.*, 1997; Pullman *et al.*, 2003a). Sin embargo, en *Pinus bungeana* la adición de ABA y PEG en el medio de maduración no incrementó la maduración de embriones (Zhang *et al.*, 2007), sino que fueron la combinación de IBA y sacarosa lo que aumentó su maduración. Se ha demostrado, por otro lado, que los embriones somáticos ortodoxos madurados en presencia de ABA toleran la desecación, lo que les confiere una mayor calidad. Sin embargo, los embriones maduros recalcitrantes no pueden sobrevivir a una deshidratación parcial o a un almacenamiento a bajas

temperaturas, por lo que en algunas especies como *Mangifera indica*, la maduración de los embriones somáticos con pulsos de manitol y ABA ha impedido la maduración precoz y ha posibilitado una vía para la conservación a corto y medio plazo de los embriones somáticos recalcitrantes (Pliego-Alfaro *et al.*, 1996). En la especie *Saccharum* sp. (Tapia *et al.*, 1999), por ejemplo, no se formaron estructuras pregerminadas en el medio suplementado con ABA, lo cual confirmó el efecto de esta hormona como regulador del crecimiento sobre la prevención de la germinación precoz de embriones.

El **etileno** es un gas que se da de forma natural en las plantas y su uso en cultivo *in vitro* no está muy extendido. Es más, puede presentar un problema debido a que los cultivos producen etileno, y en ciertas cantidades puede inhibir el crecimiento y el desarrollo de los mismos. Por lo tanto, controlar la regulación del etileno o su biosíntesis es una manera de incrementar la eficiencia del cultivo *in vitro*. Según Stasolla & Yeung (2003), una forma de mejorar el número y la calidad de los embriones somáticos es acortando el periodo de maduración para impedir la acumulación de etileno o controlando la aireación de los recipientes de cultivo abriéndolos regularmente en ambientes esterilizados. Es por ello que en ocasiones se han empleado inhibidores del etileno como estimuladores de la embriogénesis somática. Kumar *et al.* (2007) comprobaron los beneficios de 3 inhibidores del etileno en la inducción de embriones en la especie *Coffea canephora*: cloruro de cobalto (los iones cobalto inhiben la biosíntesis de etileno), ácido salicílico (inhibe la biosíntesis de etileno), y nitrato de plata (inhibe la acción del etileno). El nitrato de plata resultó ser el más efectivo de los 3, el cual ya demostró sus efectos beneficiosos en *Coffea arabica* y *Coffea canephora* (Giridhar *et al.*, 2004). Estos autores indujeron la formación de embriones somáticos directamente del explanto con altas concentraciones de nitrato de plata. También consiguieron inducir embriones somáticos secundarios con la adición de este inhibidor. El nitrato de plata ha mostrado efectos estimulatorios en la formación de embriones somáticos de otras especies como *Paspalum scrobiculaum* (Vikrant & Rashid, 2002), *Quassia amara* (Martin & Madassery, 2005), *Triticum durum* (Fernandez *et al.*, 1999) y *Pinus taeda* (Pullman *et al.*, 2003a). En contraste con estos estudios, Hatanaka *et al.* (1995) observaron que la adición de nitrato de plata y cloruro de cobalto inhibió la formación de embriones somáticos en los explantos de hoja de *Coffea canephora* y Park *et al.* (2006) comprobaron que el etileno estimuló la formación de embriones en cultivos de hoja de *Doritaenopsis*. Estos autores concluyeron que existe una relación entre el

etileno y la producción de embriones, de tal manera que, cuanto más etileno producían los cortes finos de hojas, más embriones se desarrollaban.

En varios trabajos se han observado altas concentraciones de **poliaminas** en tejidos en los que se ha inducido la embriogénesis somática. Además, la disminución de los niveles endógenos de poliaminas, a través de inhibidores de la síntesis de poliaminas, inhiben la embriogénesis somática, indicando la implicación directa de las poliaminas en este proceso (Kevers *et al.*, 2002 y referencias internas). Eudes *et al.* (2003) emplearon espermina (Spm) y espermidina (Spd) en los medios de inducción directa de embriones somáticos primarios y secundarios, y en los medios de germinación de varias especies de monocotiledóneas (*Hordeum vulgare*, *Triticum aestivum*, *T. durum*, *T. monococcum*, *T. urartu*, *Secale cereale* y *Avena sativa*). Además, Kevers *et al.* (2002) y Monteiro *et al.* (2002) demostraron un efecto beneficioso de las poliaminas (Spm concretamente) en la formación y desarrollo de los embriones somáticos de *Panax ginseng*. También fueron favorables las poliaminas en esta especie para el desarrollo simultáneo de las raíces y haces, con gran eficiencia de la espermina. Se ha demostrado también los efectos beneficiosos de otras poliaminas, como la putrescina, que aumentó significativamente la diferenciación del callo embriogénico en embriones somáticos de *Gossypium hirsutum* (Sakhanokho *et al.*, 2005) e indujo la formación de raíces *in vitro* en *Persea americana* (Ahmed *et al.*, 2001).

Los **brasinoesteroides** son también empleados para estimular la embriogénesis somática. Pullman *et al.* (2003b) comprobaron que empleando brasinolide (la forma más bioactiva de la familia de los brasinoesteroides) en el medio de inducción, se favorecía la formación de embriones en *Pinus taeda*, *Pseudotsuga menziesii*, *Picea abies* y *Oryza sativa*. Azpeitia *et al.* (2003) comprobaron que tres días de exposición de los explantos a 0.01 ó 0.1 μM de brasinoesteroides, aumentaba de 3.8 a 10.8 la producción de embriones somáticos. Sin embargo, el mismo pretratamiento durante 7 días afectaba negativamente a la formación de embriones, aunque no de callo, lo que fue debido a que los brasinoesteroides estimularon la producción de etileno, inhibidor de la embriogénesis en muchas especies.

III.1.3. Existen dos posibles vías morfogenéticas a través de las cuales los explantos pueden regenerar plantas completas: la organogénesis y la embriogénesis somática.

a) Embriogénesis Somática (ES).

Se trata de una vía de desarrollo a partir de la cual una célula del explanto se aísla y constituye el punto de partida para la obtención de un embrión somático. Los embriones somáticos, asexuales o adventicios, se han definido como los embriones iniciados a partir de células que no son producto de la fusión de gametos. Son estructuras bipolares con un eje radical-apical, y no poseen conexión vascular con el tejido materno (Litz & Jarret, 1991). Estas estructuras completan cada una de las etapas implicadas en la ontogenia de un embrión cigótico, lo que les lleva a formar plantas completas. La embriogénesis somática ocurre en dos fases:

- En la primera fase (inducción del embrión), se emplean altas concentraciones de hormonas (generalmente de auxina 2,4-D), y las células somáticas adquieren características embriogénicas por medio de una completa reorganización del estado celular, que incluye fisiológico, metabólico y de expresión génica (Jiménez, 2005).

- En la segunda fase (producción de embriones), las células se diferencian en embriones somáticos en medios con ausencia de hormonas o con bajos niveles de 2,4-D. Esta segunda fase puede dividirse en dos subetapas (Jiménez, 2005). La primera, desde el momento en que se elimina el estímulo hasta que se observa el primer cambio, y la segunda, en la que el embrión pasa por los estados típicos de la embriogénesis cigótica: globular, corazón y torpedo en especies dicotiledóneas; globular, escutelar, y coleoptilar en monocotiledóneas; o globular, cotiledonar temprana y cotiledonar tardía en coníferas. En el caso de las coníferas, aunque también aplicable a otras plantas, Stasolla & Yeung (2003) definen el proceso de la embriogénesis somática en tres etapas: 1) inducción y proliferación de tejido embriogénico, 2) maduración del embrión, 3) germinación del embrión y conversión a planta.

La **auxina** es considerada la hormona más importante en la regulación de la embriogénesis somática (ES) *in vitro*. Así, la ES ha sido descrita para más de cien especies, y en la mayoría de ellas la presencia de una auxina en el medio de cultivo, especialmente la auxina sintética 2,4-D, es el factor que determina la inducción de los embriones somáticos. Esto debe ocurrir mediante el establecimiento de un gradiente de auxinas durante la fase de inducción, el cual es esencial para iniciar la simetría bilateral

durante la embriogénesis en embriones somáticos y cigóticos de monocotiledóneas y dicotiledóneas. Para que se de este gradiente es necesario un nivel relativamente elevado de IAA en el tejido empleado como explanto (Jiménez, 2001, 2005). Se ha documentado que la adición de 2,4-D en el medio de cultivo, aumenta estos niveles endógenos de hormonas en los explantos, lo que induce la embriogénesis a las células en cultivo. Este proceso se ha observado igualmente en algunas especies al incrementar los niveles de sacarosa o de citoquinina. Una vez que disminuye el estímulo externo, con la eliminación o reducción de la concentración de auxina del medio de cultivo, los niveles endógenos de IAA caen, lo que permite el establecimiento del gradiente polar de auxinas (Jiménez, 2005). En el caso de las coníferas, el desarrollo de los embriones se inicia deteniendo la proliferación celular mediante la eliminación de las auxinas y citoquininas del medio de cultivo y la aplicación de ABA (Stasolla & Yeung, 2003).

El **nivel de hormonas endógenas** es considerado uno de los factores cruciales que determinan el potencial embriogénico de los explantos, tanto en la inducción como en la maduración de los embriones somáticos (Jiménez, 2005). Dentro de un mismo explanto hay células con distinta capacidad de respuesta. Así, existen células embriogénicas y no embriogénicas, lo que muestra que células genéticamente idénticas responden de forma diferente a un mismo estímulo (Jiménez, 2001, 2005). Se ha demostrado en varias especies que estas células, con capacidad regenerativa, tienen mayores niveles endógenos de auxinas que las células no embriogénicas. No obstante, en otras especies no han podido encontrarse estas diferencias (Jiménez, 2005). Los niveles endógenos de citoquininas, ABA, y giberelinas también parecen ser indicativos de la respuesta embriogénica en cultivo. Por este motivo, el nivel de hormonas endógenas y su relación con la capacidad embriogénica de los explantos debe ser clave en la inducción y la expresión de embriogénesis somática en genotipos recalcitrantes (Jiménez, 2001). Hay especies con mucha capacidad de respuesta, como la zanahoria, donde casi todas las partes de la planta pueden usarse para establecer cultivos embriogénicos (Jiménez, 2005 y referencias internas), y otras más recalcitrantes, donde sólo algunos tejidos, normalmente juveniles, tienen capacidad de respuesta.

Generalmente se ha inducido la ES usando el medio desarrollado por Murashige & Skoog (1962) o las modificaciones de esta formulación; la concentración alta de sales de este medio parece ser muy beneficiosa para el crecimiento de embriones somáticos. En otras ocasiones, como por ejemplo con la especie *Secale cereale* (Ma & Pulli, 2004),

el mejor medio empleado fue el AA (medio base de aminoácidos, Muller & Grafe, 1978). El medio N6, originalmente formulado para el cultivo de anteras de arroz (Chu *et al.*, 1975), fue superior al MS en la inducción de ES en embriones cigóticos maduros de *Paspalum scrobiculatum* (Vikrant & Rashid, 2003).

Dentro de los diferentes compuestos que forman los medios de cultivo, el **nitrógeno**, suministrado en su forma reducida como ión amonio, es un factor clave tanto en la inducción como en la maduración de embriones somáticos (Wu *et al.*, 2004). El nitrógeno orgánico provisto por la glutamina y la alanina, por la caseína hidrolizada o por el agua de coco, es también beneficioso y puede remplazar el nitrógeno inorgánico del medio (Litz & Jarret, 1991). También se ha demostrado que **el hierro** es igualmente eficiente para inducir la embriogénesis y el desarrollo de embriones, ya que en ausencia de este elemento, los embriones somáticos globulares no son capaces de desarrollarse hasta la madurez (Litz & Jarret, 1991). Los niveles altos de **sacarosa** parecen tener un efecto comparable al producido por el **ácido abscísico**, ya que ambos estimulan la formación de los callos embriogénicos, reducen la frecuencia de anomalías en el desarrollo e inhiben la germinación precoz (Tapia *et al.*, 1999; Li & Qu, 2002; Pullman *et al.*, 2003a). Algunos estudios han demostrado que la adición de ciertas **proteínas**, como proteínas de arabinogalactano, quitinasas y lipo-quito-oligosacáridos, estimulan las primeras fases de la ES en coníferas (Stasolla & Yeung, 2003). El **carbón activo** se ha usado para superar problemas específicos de oxidación, y su adición al medio de cultivo promueve el desarrollo de cultivos embriogénicos ya que adsorbe del medio los compuestos fenólicos y aquellas auxinas y citoquininas que inhiben el desarrollo del embrión somático (Vikrant & Rashid, 2001). En diversos estudios se ha demostrado que el uso de **poliaminas**, tales como la espermina, putrescina y espermidina, está relacionado con el control de la embriogénesis somática (Kevers *et al.*, 2002; Eudes *et al.*, 2003). Finalmente, se observa la ausencia de un mecanismo único para la inducción, desarrollo y expresión de los embriones somáticos en las diferentes especies y genotipos estudiados. Estas diferencias pueden ser debidas a la diversidad genotípica entre los cultivos y especies, o por la determinación fisiológica de los explantos (Jiménez, 2005).

Los embriones somáticos, ya diferenciados, tienen que madurar y germinar, y normalmente lo hacen en medios de maduración que contengan ABA y un osmótico (Li *et al.*, 1997). La adición de ABA al medio de cultivo se asemeja al incremento natural de la hormona durante la maduración de los embriones cigóticos, por lo que igualmente

se hace necesario para la maduración de los embriones somáticos y para la prevención de la germinación precoz, como yo citamos anteriormente (Pliego-Alfaro *et al.*, 1996; Li *et al.*, 1997; Tapia *et al.*, 1999; Pullman *et al.*, 2003a). La sacarosa es uno de los osmóticos más comúnmente usados (Tapia *et al.*, 1999), que según Iraqi & Tremblay (2001), no sólo sirve como fuente de carbono, energía y osmótico, sino, también, actúa como factor de regulación en la maduración de los embriones somáticos. Por otro lado, la maltosa, la glucosa o el polietilenglicol (PEG), han sido considerados por algunos autores como mejores carbohidratos u osmóticos que la sacarosa para la maduración de los embriones somáticos (Li *et al.*, 1997). Por ejemplo en *Picea glauca*, la adición de PEG inhibió la germinación precoz e incrementó el número de embriones cotiledonares y les proporcionó un aumento de la tolerancia a la desecación (Attree *et al.*, 1991). Estudios posteriores han demostrado además, que el PEG estimula la acumulación de los lípidos y las proteínas de almacenamiento (Stasolla & Yeung, 2003).

La conversión de los embriones maduros a plantas se da en muchas especies en ausencia de sustancias reguladoras del crecimiento, aunque en otras ocasiones es necesaria su presencia (Jiménez, 2005). La germinación y conversión de los embriones somáticos a plantas puede estimularse también con la adición al medio de GA₃, o de otras sustancias como el carbón activo (Jiménez, 2005). En ocasiones se somete a los embriones somáticos maduros a un tratamiento de desecación. Los embriones somáticos de coníferas pueden alcanzar la madurez morfológica pero no pueden germinar satisfactoriamente si no sufren un periodo de desecación (Stasolla & Yeung, 2003). Es durante el tratamiento de desecación que el embrión alcanza la madurez fisiológica, disminuye los niveles endógenos de ABA y se estimula su germinación y conversión a planta. Además del ABA, la biosíntesis de etileno se reduce tras el periodo de desecación, y se observan cambios en el metabolismo de los nucleótidos y los ácidos nucleicos (Stasolla *et al.*, 2001). Los embriones maduros de coníferas germinan y se convierten en plantas en medios sin reguladores de crecimiento y con bajas concentraciones de sacarosa.

El proceso que conduce a la embriogénesis somática puede producirse de forma directa o indirecta:

- Embriogénesis Somática Directa (ESD): el embrión se forma directamente a partir de una célula o grupo pequeño de células sin la producción de un callo intermediario. Este tipo de embriogénesis es rara en comparación con la embriogénesis

indirecta (Slater *et al.*, 2003). La embriogénesis somática directa, sin intervención de una fase callosa, se ha conseguido en varias especies de monocotiledóneas como *Allium sativum* (Sata *et al.*, 2000), *Paspalum scrobiculatum* (Vikrant & Rashid, 2001), *Oryza sativa* (Mariani *et al.*, 2000; Sahasrabudhe *et al.*, 2000; Pullman *et al.*, 2003b), *Saccharum* spp. (Desai *et al.*, 2004), *Hordeum vulgare*, *T. Monococcum*, *T. Urartu*, *Secale cereale*, *Avena sativa* (Eudes *et al.*, 2003), *Triticum durum* (Fernández *et al.*, 1999; Eudes *et al.*, 2003) o *Triticum aestivum* (Eudes *et al.*, 2003). La formación de embriones somáticos directos se ha descrito también en especies dicotiledóneas como *Arachis hypogaea* (Venkatachalam *et al.*, 1999; Little *et al.*, 2000; Radhakrishnan *et al.*, 2001), *Paulownia elongata* (Ipekci & Gozukirmizi, 2003), *Carthamus tinctorius* (Mandal & Gupta., 2002), *Coffea arabica* y *Coffea canephora* (Giridhar *et al.*, 2004), *Hyoscyamus niger* (Tu *et al.*, 2005), *Acca sellowiana* (Canahuala-inocente *et al.*, 2007), *Mangifera indica* (Pliego-Alfaro *et al.*, 1996; Xiao *et al.*, 2004), *Vigna radiata* (Kaviraj *et al.*, 2006), *Quassia amara* (Martin & Madassery, 2005), *Pinus bungeana* (Miguel *et al.*, 2004), *Pinus taeda* (Li *et al.*, 1997; Pullman *et al.*, 2003a; Pullman & Skryabina, 2007), *Picea mariana* y *Picea glauca* (Iraqi & Tremblay, 2001); *Picea abies* (Pullman *et al.*, 2003a; Ramarosandratana & Staden, 2004; Pullman & Skryabina, 2007) o *Pseudotsuga menziesii* (Pullman *et al.*, 2003a). La ES directa se asocia con una mayor uniformidad genética y citológica, y permite reducir la variación somaclonal (Jiménez, 2001). Como ya vimos anteriormente, algunos autores coinciden en que la embriogénesis somática directa sólo se da en ciertos estados de desarrollo y en tipos celulares particulares (Mariani *et al.*, 2000). Estos autores comprobaron que sólo los embriones inmaduros de *Oryza sativa* (14-17 días después de la antesis) produjeron embriones somáticos directos capaces de germinar.

- Embriogénesis Somática Indirecta (ESI). En esta vía de desarrollo se forma primero un callo a partir del explanto y los embriones se producen a partir del callo o a partir de células en suspensión producidas a partir de este callo. La formación de callo seguida de ES se ha descrito para numerosas especies, entre ellas: *Triticum aestivum* (Mendoza & Kaeppler, 2002; Turhan & Baser, 2004), *Paspalum notatum* (Grando *et al.*, 2002), *Paspalum scrobiculatum* (Vikrant & Rashid, 2002; 2003), *Echinochloa colona* (Samantaray *et al.*, 1997), *Cymbopogon martinii* (Patnaik *et al.*, 1997), *Eragrostis tef* (Bekele *et al.*, 1995), *Arachis hypogaea* (Cucco & Rossi-Jaume, 2000), *Dendrocalamus hamiltonii* (Godbole *et al.*, 2002), *Saccharum* sp. (Tapia *et al.*, 1999; Marcano *et al.*, 2002), *Manihot esculenta* (Medina *et al.*, 2003), *Zea mays* (Shohael *et al.*, 2003),

Aesculus glabra (Trick & Finer, 1999), *Psidium guajava* (Vilchez *et al.*, 2002), *Scirpus robustus* (Wang *et al.*, 2004), *Gossypium hirsutum* (Zhang *et al.*, 2001; Wu *et al.*, 2004; Sakhanokho *et al.*, 2005), *Quassia amara* (Martin & Madassery, 2005), *Coffea arabica* y *Coffea canephora* (Giridhar *et al.*, 2004; Kumar *et al.*, 2007), *Rosa* sp. (Estabrooks *et al.*, 2007), *Cynodon dactylon* x *Cynodon transvaalensis* (Li & Qu, 2002), *Cocos nucifera* (Azpeitia *et al.*, 2003; Pérez-Núñez *et al.*, 2006), *Secale cereale* (Ma & Pulli, 2004), *Cymbopogon martinii* (Patnaik *et al.*, 1997), *Acacia sinuata* (Vengadesan *et al.*, 2002), *Macrotyloma uniflorum* (Varisai Mohamed *et al.*, 2004) y *Oryza sativa* (Abdullah *et al.*, 1986) entre muchas otras.

Además de la vía directa e indirecta de producción de embriones somáticos, existe un proceso denominado Embriogénesis Somática Secundaria (ES2) por el cual se inducen nuevos embriones somáticos a partir de embriones somáticos pre-existentes (Raemakers *et al.*, 1995). En algunas especies, como *Arachis hypogaea* o *Cocos nucifera*, la ES2 se indujo en presencia de 2,4-D o NAA (Radhakrishnan *et al.*, 2001; Pérez-Núñez *et al.*, 2006). Las citoquininas han estimulado este fenómeno en algunas especies como *Cynodon dactylon* x *Cynodon transvaalensis*, *Abies numidica*, o *Mangifera indica* (Li & Qu, 2002; Vooková *et al.*, 2003, Xiao *et al.*, 2004). Tokuji & Kuriyama (2003) observaron en *Daucus carota* que un inhibidor de la síntesis de GA promovía la síntesis de ES2 a partir de los embriones primarios. En las especies *Coffea arabica* y *Coffea canephora* se indujo la ES2 en embriones cultivados en nitrato de plata (Giridhar *et al.*, 2004, Kumar *et al.*, 2007); el ABA y el manitol aumentaron el número de ES2 en *Mangifera indica* (Pliego-Alfaro *et al.*, 1996). Sin embargo, en otras especies como *Medicago sativa*, se indujo la ES2 en medio sin presencia de reguladores de crecimiento (Parrott & Bailey, 1993). En algunos casos, como en *Musa* spp., fue la adición de agua de coco la que indujo la ES2 (Khalil *et al.*, 2002).

b) Organogénesis somática

La organogénesis somática es la formación de órganos (tallos y raíces) a partir de un explanto y en respuesta a unas determinadas condiciones de cultivo. Este tipo de desarrollo se caracteriza también por una conexión vascular entre el tejido inicial y el órgano regenerado (Jiménez, 2001). La organogénesis se basa en la plasticidad del tejido vegetal, y se regula alterando los componentes del medio. Ya en el año 1957, Skoog *et al.* demostraron la importancia de las proporciones de auxina: citoquinina en la

determinación de la respuesta morfogénica *in vitro* (Litz & Jarret, 1991). Usualmente se induce la formación de callos a partir de explantos en medios que contengan auxina(s) o una proporción alta de auxina: citoquinina. La diferenciación de las yemas se logra subcultivando los callos en un medio que tenga alta relación citoquinina: auxina; en cambio, para la diferenciación de raíces se requieren medios con una relación citoquinina: auxina baja.

Existen además otros factores que deben de ser considerados para la manipulación exitosa de la organogénesis. Así, esta vía de desarrollo puede estar afectada por una gran variedad de factores como la luz, el fotoperiodo, la temperatura, la consistencia del medio, el pH, los reguladores de crecimiento o el explanto (Litz & Jarret, 1991). Virtualmente todas las partes de la planta se han utilizado como explantos para la iniciación de callo; no obstante, los tejidos jóvenes poseen mayor grado de actividad meristemática y tienden a tener más plasticidad *in vitro* (Litz & Jarret, 1991). Los medios más usados para promover la organogénesis han sido los de Murashige & Skoog (1962), White (1963), Gamborg *et al.* (1968), Linsmaier & Skoog (1965), Schenk *et al.* (1972) y Heller (1953).

La organogénesis es una vía morfogénica de origen pluricelular, que puede ser inducida, al igual que la embriogénesis somática, de forma directa e indirecta:

- Organogénesis directa. Es la formación de órganos directamente del explanto. Algunas especies en las que se ha conseguido inducir organogénesis de forma directa son: *Paspalum scrobiculatum* (Vikrant & Rashid, 2002), *Spartina alterniflora* (Wang *et al.*, 2003), *Juncus effusus* (Sarma & Rogers, 2000), *Symonanthus bancroftii* (Panaia *et al.*, 2000), *Eucalyptus gunii* (Hervé *et al.*, 2001), *Pterocarpus santalinus* (Prakash *et al.*, 2006), *Persea Americana* (Ahmed *et al.*, 2001) o *Lilium longiflorum* (Bui *et al.*, 1999).

- Organogénesis indirecta. Consiste en una desdiferenciación de las células del explanto, lo que lleva a la formación de un callo. Posteriormente las células del callo se rediferencian y se induce la formación de órganos. Algunas especies en las que se ha conseguido inducir organogénesis de forma indirecta son: *Juncus accuminatus* (Sarma & Rogers, 1998), *Typha latifolia* (Rogers *et al.*, 1998), o *Spartina alterniflora* (Wang *et al.*, 2003), entre muchas otras.

III.1.4. Los antecedentes sobre el cultivo *in vitro* en fanerógamas marinas son escasos y nos indican la naturaleza recalcitrante de estas especies.

Por el momento no se conocen estudios de micropropagación (organogénesis o embriogénesis somática) que hayan tenido éxito con fanerógamas marinas. Los estudios llevados a cabo con estas especies no han tenido como objetivo la inducción de respuestas morfogénicas *in vitro*, y se han limitado a la propagación vegetativa de explantos, como fragmentos de rizoma, o al cultivo en condiciones asépticas de plántulas germinadas *in vitro*. En algunos casos se han empleado meristemos como material vegetal de partida (Hamill & Sumb, 2002, con *Heterozostera tasmanica*; García Jiménez *et al.*, 2006, con *Cymodocea nodosa*; y Loques *et al.*, 1990, con *Posidonia oceanica*). En otros estudios se han cultivado *in vitro* plántulas procedentes de semillas germinadas en el laboratorio, como es el caso de las especies *Thalassia testudinum* (Moffler & Durako, 1984; Durako & Moffler, 1987), *Halophila ovalis*, *Posidonia australis* y *Posidonia coriacea* (Wilson & Bennett, 2002), *Halophila decipiens* (Bird *et al.*, 1998) y *Posidonia oceanica* (Balestri *et al.*, 1998; Balestri & Bertini, 2003). Los segmentos de rizomas terminales se han empleado en especies como *Ruppia maritima* (Koch & Durako, 1991, Bird *et al.*, 1993, 1996), *Halophila engelmannii* (Bird & Jewett-Smith, 1994), *Cymodocea nodosa* (Terrados, 1995) y *Posidonia oceanica* (Meinesz *et al.*, 1991; Balestri & Lardicci, 2006). En todos estos estudios se han desarrollado los medios de cultivo más apropiados para cada especie (agua de mar, nutrientes, vitaminas, fuentes de carbono...), en ocasiones suplementados con distintos reguladores de crecimiento (ver discusión Capítulo II), y se han establecido las condiciones necesarias para el mantenimiento de los cultivos (luz, temperatura...).

Según Balestri & Bertini (2003), el cultivo axénico y el tratamiento con reguladores de crecimiento puede favorecer el establecimiento de estas plántulas en futuras replantaciones. Por ejemplo, la especie *Ruppia maritima* se ha propagado *in vitro* empleando como explantos fragmentos de rizoma terminal, y cultivándolos en medio con agua de mar artificial suplementada con ½ MS y 1% sacarosa (Koch & Durako, 1991). Poco después, Bird *et al.*, en 1994, aprovechando las técnicas desarrolladas para el cultivo de esta especie (Koch & Durako, 1991; Bird *et al.*, 1993), consiguieron propagarla de forma clonal en el laboratorio y trasplantarla con éxito al medio natural.

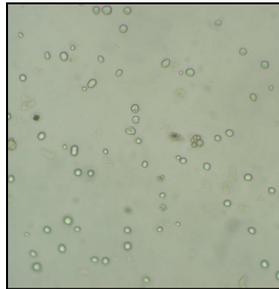
En *Cymodocea nodosa* se han establecido cultivos axénicos con meristemos apicales de rizoma terminal, mediante el empleo de una solución de antibióticos conteniendo 150 mg l⁻¹ de rifampicina, penicilina, nistatina y ampicilina y 5 mg l⁻¹ de dióxido de germanio (García Jiménez *et al.*, 2006). Estos meristemos fueron cultivados en placas de petri con agua de mar solidificada (0.8% de agar) y enriquecida con medio PES (Provasoli, 1968) y 60 g l⁻¹ sacarosa. Estos autores obtuvieron regeneración de hoja en el 80% de los explantos y callo en el 5%, en medio suplementado con TDZ. El resto de las hormonas no promovieron el crecimiento ni la regeneración. Finalmente ni la hoja ni el callo continuaron desarrollándose, ya que morían al cabo de pocas semanas (García Jiménez *et al.*, 2006). Estos mismos autores emplearon otro tipo de explantos denominados *ramets*, que contenían un internudo de rizoma, un haz y su respectiva raíz. Los *ramets* fueron sembrados en tubos con agua de mar enriquecida con medio PES y suplementado con diversos reguladores de crecimiento. El crecimiento de los *ramets* se vio influenciado por las diferentes hormonas empleadas, siendo el ácido giberélico la más efectiva.

Por otra parte, se han establecido los protocolos para el aislamiento de protoplastos en las especies *Zostera marina* (Mazzella *et al.*, 1981), *Posidonia oceanica* (Balestri & Cinelli, 1992; 2001; Carpaneto *et al.*, 2004), *Cymodocea nodosa* (Balestri & Cinelli, 2001) y *Zostera muelleri* (Garril *et al.*, 1994). En el trabajo de Balestri & Cinelli (2001) establecieron un protocolo para la obtención de protoplastos a partir de células del mesófilo en *Cymodocea nodosa* y *Posidonia oceanica*. Estos autores emplearon para el aislamiento de los protoplastos una combinación de celulasa, hemicelulasa y pectinasa, y un gradiente de centrifugación para su purificación. Observaron una mayor viabilidad de los protoplastos de *Posidonia*, que cultivados en medio MS con agua de mar, generaban la pared celular en 7 días y en algunos de ellos se formaban estructuras callosas a los 20-30 días. Sin embargo, no pudieron en ningún caso obtener plántulas derivadas de estos protoplastos, debido a la contaminación fúngica de los medios.

A pesar de que las fanerógamas marinas son aparentemente recalcitrantes a la aplicación de las técnicas de propagación *in vitro*, la bibliografía nos muestra cómo anteriormente otras especies terrestres calificadas como recalcitrantes (por ejemplo muchas especies leñosas), han sido ya cultivadas *in vitro* mediante la aplicación de nuevas aproximaciones al problema.

Así, creemos que el cultivo *in vitro* de *Cymodocea nodosa*, mediante la inducción de respuestas embriónicas u organogénicas, puede ser la solución para la restauración y repoblación de los sebadales, ya que permite obtener material vegetal, de forma rápida y abundante, sin afectar a las praderas naturales. Nos preguntamos si podríamos encontrar en el tejido embrionario de la semilla la fuente de material a través del cual, mediante la aplicación de una técnica apropiada de propagación *in vitro*, obtener material vegetal clonado con el que llevar a cabo las repoblaciones. Como ya hemos visto, los tejidos embrionarios suelen evolucionar dando más tejido embrionario por embriogénesis somática, y en tal caso podríamos aplicar la experiencia acumulada en el trabajo con semillas naturales a los embriones somáticos obtenidos artificialmente.

III.2. OBJETIVOS CAPÍTULO III



El objetivo del cultivo *in vitro* de tejidos en este Capítulo es la obtención de embriones somáticos de forma directa o indirecta (mediante la formación de callos), a partir de explantos embrionarios procedentes de semillas germinadas *in vitro*, con los que poder obtener en un futuro plantas completas aplicando la técnica de germinación y propagación desarrollada.

Se intentarán dos vías de desarrollo:

I) Inducción de respuestas morfogénicas *in vitro* (embriogénesis somática u organogénesis) sobre tejido embrionario.

Para ello se probarán:

- Dos medios de cultivo definidos: PES y MS.
- Diferentes tipos y concentraciones de reguladores de crecimiento.
- La aplicación de la técnica de *Thin Cell Layer*.
- La eliminación de la contaminación y el *browning* en cultivo.

II) Inducción de respuestas morfogénicas *in vitro* (embriogénesis somática u organogénesis) a partir del cultivo celular.

Para ello se probarán:

- La digestión de explantos hasta la liberación de células y agregados.
- Dos medios de cultivo, PES y MS.
- Distintos reguladores de crecimiento y sustancias precursoras de la embriogénesis somática.

III.3. MATERIAL Y MÉTODOS

CAPÍTULO III



III.3.1. *Inducción de respuestas morfogénicas in vitro (embriogénesis somática u organogénesis) sobre explantos embrionarios.*

III.3.1.1. **Experiencias de cultivo *in vitro* llevadas a cabo en medio PES y diferentes reguladores de crecimiento.**

En esta primera tanda de experiencias se llevaron a cabo dos estudios distintos. Por una parte se estudió la respuesta *in vitro* de 4 tipos de explantos procedentes del cotiledón, y por otra se evaluó el efecto de las diferentes hormonas y del extracto de la semilla como componentes del medio de cultivo e inductores de respuestas morfogénicas. Empleamos el protocolo descrito a continuación:

a) Material vegetal y esterilización del explanto

Se empleó como material vegetal de partida plántulas obtenidas a partir de semillas germinadas en condiciones axénicas, de acuerdo a lo descrito en el Capítulo I. Dos semanas después de la siembra, las semillas han germinado y las plántulas están desarrollando el cotiledón. Tienen una longitud que varía entre 0.40 y 4.20 cm (2.22 ± 1.24 cm), y el color puede ser verde o blanco, según si están más o menos desarrolladas (Fig. III.1). En este momento, se extrajo la cubierta externa de la semilla, para favorecer la esterilización (Fig. III.2), y las plántulas se sumergieron durante 10 minutos en hipoclorito de sodio al 10% en agua de mar esterilizada y una gota de Tween 80 como agente tensoactivo (Ailstock *et al.*, 1991). A continuación, se lavaron 3 veces en agua de mar esterilizada.

Por otro lado, se esterilizaron en el autoclave (121°C, 20 min) tubos de ensayo conteniendo 9 ml de agua de mar, a los cuales se les añadió, una vez fríos, 1 ml de solución de antibiótico (proporción 1/10) (Tabla III.1), previamente esterilizada con filtros de 0.22 μ M (Millipore) (García Jiménez *et al.*, 2006). Cada plántula se sumergió en 1 tubo de ensayo y se dejó esterilizar durante 24-48 horas.

De las plántulas esterilizadas, se extrajeron, una vez eliminado el hipocotilo, cuatro tipos de explantos (de unos 5 mm de longitud), según su posición a lo largo del cotiledón: explantos conteniendo el meristemo apical (SAM), explantos conteniendo el meristemo radicular (RAM), explantos conteniendo el SAM y el RAM (SAM + RAM) y explantos conteniendo el ápice del cotiledón (ÁPICE) (Fig. III.1 y III.2).

Tabla III.1. Solución de antibióticos para *Cymodocea nodosa* en 100 ml de agua dos veces destilada y esterilizada con filtros de 0.22 μ M (Millipore) (García Jiménez *et al.*, 2006).

Solución Antibiótico	mg/100ml DDW
Rifampicina	37,5
Penicilina	37,5
Ampicilina	37,5
Nistatina	37,5
Dióxido de Germanio	1,25

b) El medio de cultivo

El medio de cultivo se basó en la formulación de Provasoli (PES, Provasoli Enriched Seawater, Provasoli, 1968) y se reformuló en base a experimentos previos con *Cymocea nodosa* (García Jiménez *et al.*, 2006). Los diferentes compuestos y soluciones nutritivas del medio de cultivo PES modificado se recogen en la Tabla III.2.

Tabla III.2. Composición final del medio de cultivo PES reformulado. Las soluciones PII, EDTA-Fe y Vitaminas se detallan en material y métodos del Capítulo I.

Compuesto o solución	Cantidad
NH ₄ Cl	70 mg
KH ₂ PO ₄	10 mg
Solución PII	1 ml
Solución EDTA-Fe	0,5 ml
Solución vitaminas	1 ml
Agar	8 g
Sacarosa	30 g
Agua de mar	1000 ml
Antibióticos	10 ml
L-Glutamina	100 mg
Hormonas (PGRs)	Según tratamiento

Una vez preparado el medio de cultivo, se calentó y se esterilizó en el autoclave (121°C, 20 min). Una vez estéril, se incorporó un volumen de la solución de antibiótico en proporción 1:10 (v/v) (Tabla III.1). Los cultivos se enriquecieron, además, con diferentes hormonas y concentraciones. Estas hormonas se prepararon previamente en soluciones stock, disueltas según corresponde a su naturaleza, y esterilizadas por medio de filtros con un diámetro de poro de 0.22 μM (Millipore) (Tabla III.3). Las hormonas fueron añadidas al medio según los tratamientos detallados en las Tabla III.4 y III.5.

Finalmente, el medio de cultivo fue dispensado en placas de petri (c.a. 10 ml), donde se sembraron un total de 1400 explantos (Fig. III.3), con un promedio de 18 explantos por experiencia (Tablas III.4 y III.5). Los cultivos se mantuvieron durante un periodo aproximado de 30 días bajo condiciones controladas: $22 \pm 2^\circ\text{C}$, fotoperiodo 18:6 (luz:oscuridad) y 30 μmoles de fotones $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

Tabla III.3. Hormonas empleadas en las diferentes experiencias de inducción de respuestas morfológicas *in vitro*, su disolución y preparación de soluciones stock. (* = disoluciones acuosas).

	Peso molecular (g)	Disolución * (10 ml)	Gramos	Concentración solución Stock
NAA	186.2	Etanol (90%)	9.3×10^{-3}	$5 \times 10^{-3} \text{ M}$
			9.0×10^{-2}	$5 \times 10^{-2} \text{ M}$
2,4-D	221	Etanol (90%)	1.0×10^{-2}	$5 \times 10^{-3} \text{ M}$
			1.1×10^{-1}	$5 \times 10^{-2} \text{ M}$
KIN	215.2	Etanol (90%)	1.0×10^{-2}	$5 \times 10^{-3} \text{ M}$
			1.0×10^{-1}	$5 \times 10^{-2} \text{ M}$
TDZ	220.25	Acetona $\text{CH}_3(\text{CO})\text{CH}_3$	1.0×10^{-2}	$5 \times 10^{-3} \text{ M}$
			1.1×10^{-1}	$5 \times 10^{-2} \text{ M}$
BAP	225.2	HCl (1N)	1.0×10^{-2}	$5 \times 10^{-3} \text{ M}$
			1.1×10^{-1}	$5 \times 10^{-2} \text{ M}$
PICL	241.46	Etanol (90%)	1.2×10^{-2}	$5 \times 10^{-3} \text{ M}$
			1.2×10^{-1}	$5 \times 10^{-2} \text{ M}$
IBA	203.23	NaOH (0.1 N)	1.0×10^{-2}	$5 \times 10^{-3} \text{ M}$
			1.0×10^{-1}	$5 \times 10^{-2} \text{ M}$
Spm	145.24	HCl (0.1N)	7.2×10^{-3}	$5 \times 10^{-3} \text{ M}$
			7.0×10^{-2}	$5 \times 10^{-2} \text{ M}$
Put	88.15	HCl (0.1N)	4.4×10^{-3}	$5 \times 10^{-3} \text{ M}$
			4.0×10^{-2}	$5 \times 10^{-2} \text{ M}$

Tabla III.4. Detalle de los distintos tratamientos hormonales (Control; Auxinas: NAA, 2,4-D, PICL, IBA; Citoquininas: BAP, TDZ, KIN) empleados en los experimentos de cultivo *in vitro* llevados a cabo con diferentes explantos y medio de cultivo PES. EXT: Extracto de semillas (1ml/100ml de medio).

Tratamientos Hormonales (n = 18 en cada experiencia)		
Sin hormonas	Concentración	Nº repeticiones
CONTROL	-	1
CONTROL	- + EXT	1
Auxinas	Concentración	Nº repeticiones
PICL	10 ⁻³ M	1
	10 ⁻⁴ M	1
	10 ⁻⁵ M	2
	10 ⁻⁶ M	3
	10 ⁻⁶ M + EXT	1
	10 ⁻⁷ M	2
	10 ⁻⁹ M	2
IBA	10 ⁻⁶ M + EXT	1
2,4-D	10 ⁻³ M	1
	10 ⁻⁶ M	1
NAA	10 ⁻⁶ M	1
NAA + PICL	10 ⁻⁶ M + 10 ⁻⁶ M	2
Citoquininas	Concentración	Nº repeticiones
TDZ	10 ⁻⁴ M	1
	10 ⁻⁵ M	2
	10 ⁻⁶ M	2
	10 ⁻⁶ M + EXT	5
	10 ⁻⁷ M	1
	10 ⁻⁹ M	2
KIN	10 ⁻³ M	1
	10 ⁻⁶ M	1
BAP	10 ⁻⁶ M	1

Tal y como se detalla en la Tabla III.4, en determinadas experiencias se añadió un extracto nutritivo de la propia semilla. La preparación del extracto de semilla se realizó limpiando las semillas previamente con hipoclorito sódico comercial al 10% y una gota de Tween 80 como agente tensoactivo. Las semillas fueron entonces pesadas sin la cubierta externa y pulverizadas en un mortero. Este extracto fue dispuesto en un vial de vidrio, añadiéndole HCl (6N) en una ratio de 100 mg de muestra: 300 µl de HCl. Los viales se sellaron bajo llama y se colocaron en una estufa (P>Selecta) a 100°C durante toda la noche. Se extrajo el contenido de los viales y se colocaron en tubos eppendorf. Los tubos eppendorf se centrifugaron 2 veces a 10000g durante 5 minutos. Se recogió el sobrenadante, neutralizándolo con NaOH (6N). El extracto de la semilla fue esterilizado junto al medio de cultivo, y añadido en una ratio de 1:100.

Tabla III.5. Detalle de los distintos tratamientos hormonales empleados en los experimentos de cultivo *in vitro* llevados a cabo con diferentes explantos y medio de cultivo PES. Combinación de Auxinas (Aux): NAA, 2,4-D, PICL; Citoquininas (Ck): BAP, TDZ, KIN; y/o Poliaminas (Pol): Spm, Put.

Tratamientos Hormonales (n = 18 en cada experiencia)		
Aux+ Ck+ Pol	Concentración	Nº repeticiones
NAA + BAP	$10^{-6}\text{M} + 10^{-6}\text{M}$	2
NAA + BAP + Spm	$10^{-6}\text{M} + 10^{-6}\text{M} + 10^{-3}\text{M}$	1
NAA + KIN	$10^{-6}\text{M} + 10^{-6}\text{M}$	2
NAA + KIN + Spm	$10^{-6}\text{M} + 10^{-5}\text{M} + 10^{-3}\text{M}$	1
NAA + KIN + Put	$10^{-6}\text{M} + 10^{-5}\text{M} + 10^{-3}\text{M}$	1
2,4-D + KIN	$10^{-6}\text{M} + 10^{-6}\text{M}$	2
2,4-D + KIN + Spm	$10^{-6}\text{M} + 10^{-6}\text{M} + 10^{-3}\text{M}$	1
2,4-D + KIN + Put	$10^{-6}\text{M} + 10^{-6}\text{M} + 10^{-3}\text{M}$	1
PICL + BAP	$10^{-6}\text{M} + 10^{-6}\text{M}$	2
2,4-D + BAP	$10^{-6}\text{M} + 10^{-6}\text{M}$	2
PICL + TDZ	$10^{-6}\text{M} + 10^{-6}\text{M}$	1
	$10^{-6}\text{M} + 10^{-7}\text{M}$	1
	$10^{-6}\text{M} + 10^{-9}\text{M}$	1
	$10^{-7}\text{M} + 10^{-6}\text{M}$	1
	$10^{-7}\text{M} + 10^{-7}\text{M}$	1
	$10^{-9}\text{M} + 10^{-6}\text{M}$	1
	$10^{-9}\text{M} + 10^{-7}\text{M}$	2
	$10^{-9}\text{M} + 10^{-9}\text{M}$	2
TDZ + Spm	$10^{-6}\text{M} + 10^{-3}\text{M}$	1
TDZ + Put	$10^{-6}\text{M} + 10^{-3}\text{M}$	1

c) Determinación de la respuesta obtenida *in vitro*. Histología.

La respuesta obtenida *in vitro* en relación al tipo de explanto empleado y a la combinación de hormonas añadidas se determinó 30 días después de iniciado el cultivo mediante el empleo de 4 índices:

- Índice 1. Porcentaje de explantos muertos (coloración marrón o *Browning*).
- Índice 2. Porcentaje de explantos vivos (coloración verde o blanca).
- Índice 3. Porcentaje de callos y/o abultamientos formados.
- Índice 4. Porcentaje de hojas regeneradas.

Además, realizamos la histología de los callos y/o abultamientos obtenidos en cultivo, para lo que seguimos el protocolo descrito en el Capítulo I. Las secciones fueron igualmente observadas con un microscopio óptico, Olympus U-SPT y una lupa Olympus SZ-PT, fotografiadas con una cámara de fotos MicroPublisher 3.3 RTV, y tratadas con un programa de captación de fotos QCapture.

III.3.1.2. Experiencias de cultivo *in vitro* llevadas a cabo en medio MS y aplicación de la técnica *Thin Cell Layer*.

La técnica de *Thin Cell Layer* fue desarrollada por Tran Thanh Van (Nhut *et al.*, 2003) y consiste en emplear delgadas capas de células (0.2-0.4 mm) como explanto para inducir la embriogénesis somática. En este apartado determinaremos la importancia de la reducción del tamaño del explanto y de la adición y/o eliminación de la sal del medio de cultivo.

a) Material vegetal y esterilización del explanto

Se empleó como material vegetal de partida, al igual que en los primeros experimentos, plántulas obtenidas a partir de semillas germinadas en condiciones axénicas y esterilizadas según se ha descrito en la experiencia anterior. Se obtuvieron los explantos seccionando el cotiledón de las plántulas en fragmentos de 1-2 cm, a los cuales se les aplicó un nuevo proceso de esterilización, consistente en una inmersión durante 10 minutos en una solución de KBr (2%) y Triton (1%) en agua bidestilada y esterilizada. A continuación, se lavaron con agua bidestilada y se cortaron en láminas en 1-2 mm. Estas láminas fueron nuevamente esterilizadas en la misma solución de KBr durante 5 min y lavadas varias veces en agua bidestilada.

b) El medio de cultivo.

En las Tablas III.6-III.9 se muestran los compuestos y soluciones nutritivas del medio de cultivo MS (Murashige & Skoog, 1962) empleados en estos experimentos.

Tabla III.6. Composición de las soluciones de macronutrientes usada en la elaboración del medio MS (se preparan por separado y 10 veces concentrados, en 100 ml de agua bi-destilada).

Macronutrientes	Concentración Solución Stock (g/100ml)	Concentración Final al medio (g/L)
NH ₄ NO ₃	16.5	1.65
KNO ₃	19	1.9
CaCl ₂ ·2H ₂ O	4.4	0.44
MgSO ₄ ·7H ₂ O	3.7	0.37
KH ₂ PO ₄	1.7	0.17
Na ₂ -EDTA	0.37	0.037
FeSO ₄ ·7H ₂ O	0.278	0.027

Tabla III.7. Composición de la solución de micronutrientes usada en la elaboración del medio MS (se preparan juntos y 100 veces concentrados, en 100 ml de agua bi-destilada).

Micronutrientes	Concentración Solución Stock (mg/100ml)	Concentración Final al medio (mg/L)
SO ₄ Mn. H ₂ O	1690	16.90
SO ₄ Zn. 7H ₂ O	860	8.6
SO ₄ Cu ₄ . 5H ₂ O	2,5	0.025
Cl ₂ Co. 6H ₂ O	2.5	0.025
KI	83	0.83
BO ₃ H ₃	620	6.2
MoO ₄ Na ₂ . 2H ₂ O	25	0.25

Tabla III.8 .Composición de la solución de vitaminas usada en la elaboración del medio MS (se preparan juntos y 50 veces concentrados, en 50 ml de agua bi-destilada).

Vitaminas	Concentración Solución Stock (mg/50ml)	Concentración Final al medio (mg/L)
Tiamina ClH	5	0.1
Ácido Nicotínico	25	0.5
Piridoxina ClH	25	0.5
Glicina	100	2

Tabla III.9. Composición final del medio de cultivo MS.

Compuesto o solución	Cantidad
Macronutrientes	10 ml
Micronutrientes	1 ml
Solución vitaminas	1 ml
Agar	8 g
Sacarosa	30 g
Carbón activo	1 g
Agua bi-destilada	1000 ml
pH	5.8

El medio MS se dispuso en caliente a razón de 10 ml por tubo de ensayo, los cuales se esterilizaron en el autoclave (121°C, 20 min). Los tubos se colocaron en la cámara de cultivo durante 30 días a 22-24°C y 30 $\mu\text{moles de fotones m}^{-2} \text{ s}^{-1}$.

c) Experiencias *Thin Cell Layer*

Se llevaron a cabo 4 experiencias distintas con láminas finas de 1 ó 2 mm extraídas del cotiledón, que fueron dispuestas en medios con o sin sal (NaCl) y en presencia o ausencia de reguladores del crecimiento ($n = 30$ en cada experiencia). La osmolaridad en medios sin NaCl es cercana a 0 Osmol Kg^{-1} , mientras que en medios con NaCl (3,20%) es similar a la del agua de mar (1.028 Osmol Kg^{-1}), siguiendo el *Handbook of chemistry and Physics* (Weast & Astle, 1981).

1. MS
2. MS + Hormonas (TDZ 0.5 μM + NAA 5 μM + Spm 1 μM)
3. MS + NaCl (3,20%)
4. MS + NaCl (3,20%) + Hormonas (TDZ 0.5 μM + NAA 5 μM + Spm 1 μM)

Las hormonas añadidas al medio se prepararon previamente en soluciones stock, disueltas según corresponde a su naturaleza y esterilizadas por medio de filtros de tamaño de poro de 0.22 μM (Millipore) (Tabla III.3).

d) Determinación de la respuesta obtenida *in vitro*.

Nuevamente, determinamos la respuesta obtenida *in vitro* 30 días después de iniciado el cultivo mediante el empleo de 4 índices:

- Índice 1. Porcentaje de explantos muertos (coloración marrón o *Browning*).
- Índice 2. Porcentaje de explantos vivos (coloración verde o blanca).
- Índice 3. Porcentaje de hojas regeneradas.
- Índice 4. Porcentaje de explantos asépticos.

III.3.1.3. Experiencias de cultivo *in vitro* llevadas a cabo en medio MS y tratamiento del explanto para reducir el *browning* en cultivo.

El *browning* o ennegrecimiento de los explantos está asociado a la oxidación de los polifenoles *in vitro* (Dalal *et al.*, 2004). Este fenómeno disminuye la regeneración de muchas especies leñosas y recalcitrantes, ya que puede inhibir el crecimiento de los callos, la diferenciación de los haces o el enraizamiento (Tang & Newton, 2004). Las experiencias descritas a continuación se llevaron a cabo con el objetivo de eliminar y/o reducir el *browning* de los explantos en cultivo, mediante la aplicación de diversos tratamientos *antibrowning* descritos previamente por diferentes autores (Panaia *et al.*, 2000; Prakash *et al.*, 2006).

a) Material vegetal y esterilización del explanto.

Se empleó como material vegetal de partida explantos inmaduros (frutos y semillas) y explantos maduros (plántulas germinadas según la metodología de siembra descrita en el Capítulo I).

Explantos maduros. Al igual que en experiencias anteriores, se extrajo la cubierta externa de la semilla para favorecer la esterilización, y se sumergieron las plántulas 10 minutos en hipoclorito de sodio al 10% con agua de mar esterilizada y una gota de Tween 80 (Ailstock *et al.*, 1991), para lavarse a continuación en agua de mar esterilizada.

Los cotiledones de las plántulas recién germinadas se dividieron en fragmentos de 1-2 cm y se esterilizaron mediante inmersión durante 10 minutos en solución de KBr al 2%, seguido de varios lavados con agua bidestilada. Los explantos se cortaron sin que les diera el aire en fragmentos de 3-5 mm, inmersos en una solución antioxidante conteniendo 100 mg l⁻¹ de ácido ascórbico y de ácido cítrico, respectivamente, y agua bidestilada, previamente esterilizada en autoclave.

En esta ocasión se utilizaron tres tipos de explanto: los Ápices, el SAM y el RAM + SAM (Fig. III.1 y III.2). Se dejaron reposar los explantos durante 1 hora en la misma solución antioxidante y se esterilizaron nuevamente en solución de KBr al 2% durante 5 min. Finalmente se lavaron 3 veces con agua bidestilada.

Explantos inmaduros. Se eliminó del fruto y de la semilla el tegumento externo, y se extrajo la cubierta para favorecer la esterilización. Al igual que en experiencias anteriores, se sumergieron durante 1 minuto en hipoclorito de sodio al 10% con agua de mar esterilizada y una gota de Tween 80 (Ailstock *et al.*, 1991), lavándose posteriormente 3 veces en agua de mar esterilizada.

A continuación, los explantos inmaduros (frutos y semillas) sufrieron un proceso de esterilización más suave que los explantos maduros, ya que se trataba de material vegetal muy joven que podía ser afectado por un exceso de esterilización. Estos explantos se sumergieron sin fragmentar en solución antioxidante (100 mg l⁻¹ de ácido ascórbico y ácido cítrico, respectivamente) y se eliminó el almidón de la semilla. Los cotiledones se esterilizaron en solución de KBr al 2% y 1% de Triton en agua bidestilada durante 1 minuto, para lavarse finalmente 3 veces en agua bidestilada.

b) El medio de cultivo.

El medio de cultivo empleado fue el de Murashige y Skoog (1962) (Tablas III.6-III.9) en ausencia de agua de mar o NaCl (0 Osmol Kg⁻¹). En esta ocasión el medio de cultivo fue suplementado con una solución compuesta de ácido ascórbico (100 mg l⁻¹) y ácido cítrico (100 mg l⁻¹) como agentes antioxidantes (Panaia *et al.*, 2000; Prakash *et al.*, 2006), y la hormona 2,4-D (10⁻⁴ M y 10⁻⁶ M) como estimulante de la embriogénesis somática (Raemakers *et al.*, 1995).

El pH del medio de cultivo se ajustó a 5.8. El medio fue dispuesto en tubos de cultivo, los cuales se esterilizaron a continuación en autoclave (121°C, 20 min). Los tubos se colocaron en la cámara de cultivo, a 22-24°C, manteniéndolos en oscuridad durante 24-48 horas y posteriormente en luz no directa suministrada por fluorescentes de 30 μmoles de fotones m⁻² s⁻¹.

c) Experiencias antibrowning. Tratamientos.

Explantos maduros. Ápices, SAM y RAM + SAM (n = 9 para cada explanto):

- MS + Ác. ascórbico (100 mg l⁻¹) + Ác. cítrico (100 mg l⁻¹) + 2,4-D (10⁻⁶ M).

Explantos inmaduros. Se diferencian dos tipos de explantos inmaduros: semillas y frutos, sometidos a los siguientes tratamientos.

- Semillas 10 días en imbibición con salinidad a 18 psu (n = 45)
 - MS + Ác. ascórbico (100 mg l⁻¹) + Ác. cítrico (100 mg l⁻¹) + 2,4-D (10⁻⁴ M).
- Semillas 10 días en imbibición con salinidad a 18 psu (n = 29)
 - MS + Ác. ascórbico (100 mg l⁻¹) + Ác. cítrico (100 mg l⁻¹) + 2,4-D (10⁻⁶ M).
- Semillas 2 días en imbibición con salinidad a 18 psu (n = 99)
 - MS + Ác. ascórbico (100 mg l⁻¹) + Ác. cítrico (100 mg l⁻¹) + 2,4-D (10⁻⁴ M).
- Frutos (n = 11)
 - MS + Ác. ascórbico (100 mg l⁻¹) + Ác. cítrico (100 mg l⁻¹) + 2,4-D (10⁻⁶ M).

d) Determinación de la respuesta obtenida *in vitro*.

Determinamos la respuesta obtenida *in vitro*, 30 días después de la siembra, mediante el empleo de los 4 índices descritos previamente:

- Índice 1. Porcentaje de explantos muertos (coloración marrón o *Browning*).
- Índice 2. Porcentaje de explantos vivos (coloración verde o blanca).
- Índice 3. Porcentaje de hojas regeneradas.
- Índice 4. Porcentaje de explantos asépticos.

III.3.2. Inducción de respuestas morfogénicas *in vitro* (embriogénesis somática u organogénesis) a partir del cultivo celular. Inducción y mantenimiento de los cultivos.

a) Material vegetal y esterilización del explanto.

El material vegetal empleado fueron plántulas obtenidas a partir de semillas esterilizadas y germinadas según la metodología descrita en el Capítulo I. Los cotiledones (2 por digestión enzimática), fueron segmentados en trozos de 1 mm, los cuales fueron esterilizados por inmersión durante 1 min en etanol (70%). A continuación se esterilizaron durante 30 min en hipoclorito sódico (2%) y lavados 3 veces con agua destilada estéril en autoclave.

b) Digestión enzimática.

Para favorecer la separación del contenido celular de la pared, se incubaron los explantos (c.a. 100 mg de peso fresco) durante 5 min en medio de plasmolisis, previamente esterilizado en autoclave (Tabla III.10).

A continuación, los explantos fueron dispuestos en 2 ml de medio estéril de plasmolisis, conteniendo las enzimas hidrolíticas necesarias para la digestión de la pared celular: 1% de celulasa (Sigma Co. USA, 6.9 unidades mg^{-1}) y 1% de hemicelulasa (Sigma Co. USA, 1.5 unidades mg^{-1}). La solución de enzimas fue esterilizada por filtración, haciéndola pasar por filtros de tamaño de poro de 0.22 μm (Millipore). La digestión se llevó a cabo incubando los explantos durante 18h a 36°C, en un horno de hibridación (Stuart S130H), oscuridad y agitación (50 rpm).

Tabla III.10. Medio de plasmolisis.

Medio de plasmolisis	Concentración (g l^{-1})
KH_2PO_4	0.0272
$\text{CaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$	1.480
$\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$	0.025
KNO_3	0.101
KI	0.16
$\text{MgSO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$	0.246
Ácido cítrico	0.2
Glicina	0.1
MES buffer	1
Manitol	130
pH	5.8

Las células liberadas fueron tamizadas por una malla metálica estéril de 60 μm (Sigma Co. USA), y se centrifugaron a 1000 g durante 10 minutos. El pellet, conteniendo las células libres y agregados, fue resuspendido suavemente en medio conteniendo las soluciones nutritivas del medio MS (Tablas III.6-III.8) y centrifugado en varias ocasiones para retirar el manitol.

c) Medio de cultivo

El pellet resuspendido fue dispuesto en medio MS (Tablas III.6-III.8), en ausencia de agua de mar o NaCl, y conteniendo hormonas estimulantes de la embriogénesis somática (10^{-4} M de 2,4-D y 10^{-4} M de BAP), agentes antioxidantes (75 mg l⁻¹ de ác. ascórbico y 10 mg l⁻¹ de ác. cítrico), y carbohidratos (30 g l⁻¹ de sacarosa y 100 mg l⁻¹ de inositol).

El pH del medio fue ajustado a 5.8. Se esterilizó por autoclave y los reguladores añadidos a partir de una solución stock esterilizada por filtración (filtros de membrana de 0.2 µm; Millipore) (Tabla III.3). Las condiciones experimentales del cultivo fueron 28 °C y oscuridad. A partir de la 5ª semana se transfirieron los cultivos a condiciones de luz (30 µmoles de fotones m⁻² s⁻¹) y fotoperiodo 18:6. Los cultivos se repitieron por duplicado con 5 réplicas en cada caso. La duración del experimento fue de tres meses.

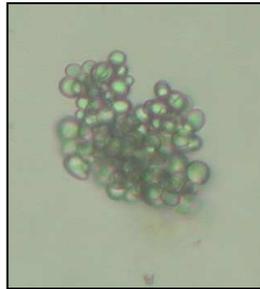
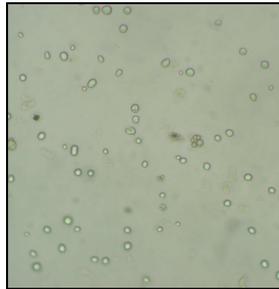
d) Adición al medio de sustancias precursoras de la embriogénesis somática.

Transcurrida una semana del cultivo en presencia de la auxina 2,4-D y la citoquinina BAP, se recultivó a medio nuevo sin hormonas y con sustancias favorecedoras de la producción, maduración y germinación de los embriones somáticos: glutatión oxidado y glutatión reducido, en concentraciones de 2 mM (Belmonte *et al.*, 2003, 2005a, 2005b), así como caseína hidrolizada a la misma concentración (Miguel *et al.*, 2004). A partir de este momento se realizaron subcultivos cada dos semanas en el mismo medio de inducción de embriogénesis somática. A las 9 semanas en cultivo, el recultivo se realizó con una malla en el fondo de la placa para favorecer la adhesión de las células y la formación de nuevas estructuras.

e) Determinación de la respuesta obtenida *in vitro*.

La respuesta del cultivo, tanto en presencia de los reguladores como de los precursores, se valoró semanalmente por registro fotográfico. Se midió, además, la productividad del sistema y la capacidad de crecimiento contando el número de células presentes en distintos campos microscópicos (n = 30) a t = 0 y t = 7 días. Los datos se expresan como media ± error estándar. Los registros se realizaron directamente sobre los cultivos, para no comprometer la asepsia, y bajo un fotomicroscopio óptico marca Olympus CK40

III.4. RESULTADOS CAPÍTULO III



III.4.1. Inducción de respuestas morfogénicas *in vitro* (embriogénesis u organogénesis) sobre explantos embrionarios.

III.4.1.1. Experiencias de cultivo *in vitro* llevadas a cabo en medio PES y diferentes reguladores de crecimiento.

Los datos obtenidos en este set de experimentos (4 tipos de explantos, distintas hormonas y concentraciones) se analizaron atendiendo al tipo de explanto empleado y a la combinación de hormonas añadidas.

a) Respuestas inducidas en función de las distintas hormonas empleadas.

Los valores de los cuatro índices empleados, de acuerdo a las hormonas presentes en los cultivos, se exponen en las Tablas III.11-III.14.

Tabla III.11. Índices empleados (%) para determinar la respuesta morfogénica *in vitro* en explantos cultivados en ausencia de hormonas. Control = medio PES; Control + extracto = medio PES enriquecido con extracto de semilla (1ml/100ml). n.d.= valores no determinados. N° medio de explantos en cada experiencia: 18. Tiempo medio de cultivo: 30 días.

Tratamiento	ÍNDICES (%)			
	<i>Browning</i>	Explantos verdes	Abultamiento/callos	Regeneración hoja
CONTROL	76	24	2	3
CONTROL + Extracto	32	67	n.d.	19

Tabla III.12. Índices (%) empleados para determinar la respuesta morfogénica *in vitro* en explantos cultivados en medio PES conteniendo AUXINAS (PICL, 2,4-D, IBA o NAA, en concentraciones de 10^{-3} M a 10^{-9} M, suplementados o no con extracto de semilla, EXT: 1ml/100ml). n.d.= valores no determinados. N° medio de explantos por experiencia: 18. Tiempo medio de cultivo: 30 días.

Tratamiento		ÍNDICES (%)			
Auxinas	Concentración	<i>Browning</i>	Explantos verdes	Abultamiento /callos	Regeneración hoja
PICL	10^{-3} M	100	0	0	0
	10^{-4} M	45	56	6	0
	10^{-5} M	67	32	5	3
	10^{-6} M	70	30	6	2
	10^{-6} M + EXT	57	43	n.d.	6
	10^{-7} M	62	37	4	0
	10^{-9} M	50	50	9	5
IBA	10^{-6} M + EXT	48	52	n.d.	0
2,4-D	10^{-3} M	98	2	0	6
	10^{-6} M	75	25	0	25
NAA	10^{-6} M	65	35	0	7
NAA + PICL	10^{-6} M + 10^{-6} M	45	55	0	0

Tabla III.13. Índices (%) empleados para determinar la respuesta morfogénica *in vitro* en explantos cultivados en medio PES conteniendo CITOQUININAS (TDZ, KIN o BAP, en concentraciones de 10^{-4} M a 10^{-9} M, suplementados o no con extracto de semilla, EXT: 1ml/100ml de medio). n.d.= valores no determinados. N° medio de explantos por experiencia: 18. Tiempo medio de cultivo: 30 días.

Tratamiento		INDICES (%)			
Citoquininas	Concentración	<i>Browning</i>	Explantos verdes	Abultamiento/ callo	Regeneración hoja
TDZ	10^{-4} M	58	42	0	0
	10^{-5} M	64	36	0	9
	10^{-6} M	65	35	2	12
	10^{-6} M + EXT	49	50	n.d.	14
	10^{-7} M	66	33	5	5
	10^{-9} M	51	48	7	5
KIN	10^{-3} M	99	0	0	0
	10^{-6} M	52	48	0	2
BAP	10^{-6} M	57	42	0	0

Tabla III.14. Índices (%) empleados para determinar la respuesta morfogénica *in vitro* en explantos cultivados en medio PES conteniendo una combinación de AUXINAS (PICL, 2,4-D o NAA), CITOQUININAS (TDZ, KIN o BAP) y/o POLIAMINAS (Spm o Put), en concentración de 10^{-3} M a 10^{-9} M. n.d.= valores no estudiados. N° medio de explantos: 18. Tiempo medio de cultivo: 30 días.

Tratamiento		INDICES (%)				
Hormonas	Concentración	<i>Browning</i>	Explantos verdes	Abultamiento/ callo	Regeneración hoja	
NAA + BAP	10^{-6} M + 10^{-6} M	50	49	5	9	
NAA + BAP + Spm	10^{-6} M + 10^{-6} M + 10^{-3} M	40	61	45	0	
NAA + KIN	10^{-6} M + 10^{-6} M	70	29	0	0	
NAA + KIN + Spm	10^{-6} M + 10^{-5} M + 10^{-3} M	78	22	n.d.	8	
NAA + KIN + Put	10^{-6} M + 10^{-5} M + 10^{-3} M	75	25	n.d.	8	
2,4-D + KIN	10^{-6} M + 10^{-6} M	49	49	9	5	
2,4-D + KIN + Spm	10^{-6} M + 10^{-6} M + 10^{-3} M	73	27	n.d.	0	
2,4-D + KIN + Put	10^{-6} M + 10^{-6} M + 10^{-3} M	65	35	n.d.	0	
PICL + BAP	10^{-6} M + 10^{-6} M	68	32	5	5	
2,4-D + BAP	10^{-6} M + 10^{-6} M	29	69	9	5	
PICL + TDZ	10^{-6} M + 10^{-6} M	75	25	17	0	
	10^{-6} M + 10^{-7} M	83	16	8	0	
	10^{-6} M + 10^{-9} M	92	8	8	0	
	10^{-7} M + 10^{-6} M	75	25	8	0	
	10^{-7} M + 10^{-7} M	58	41	8	0	
	10^{-9} M + 10^{-6} M	58	41	8	0	
	10^{-9} M + 10^{-7} M	58	42	0	8	
	10^{-9} M + 10^{-9} M	29	69	14	9	
	TDZ + Spm	10^{-6} M + 10^{-3} M	80	20	n.d.	0
		10^{-6} M + 10^{-3} M	50	50	n.d.	0

En las Tablas III.11-III.14, donde se resume el efecto de las diferentes hormonas sobre los explantos embrionarios, observamos ciertas respuestas organogénicas, como la inducción de abultamientos o la regeneración de hojas, pero no podemos concretar acerca de ningún tratamiento más efectivo. En los medios sin hormonas, denominados control (Tabla III.11), obtenemos un máximo de regeneración de hojas del 19%. En el caso de los tratamientos llevados a cabo en medios conteniendo auxinas (Tabla III.12), las respuestas más favorables se observaron con las hormonas 2,4-D (10^{-6} M) y PICL (10^{-9} M), donde se obtuvieron un 25% de regeneración de hoja y un 9% de abultamientos respectivamente. Los tratamientos con citoquininas respondieron de manera similar, con máximos porcentajes de regeneración de hojas en torno al 14% con concentraciones de 10^{-6} M de TDZ suplementado con extracto de semilla, y un máximo del 7% de abultamientos en 10^{-9} M de TDZ (Tabla III.13). Cuando combinamos las auxinas, las citoquininas y las poliaminas (Tabla III.14), las respuestas son variadas, no respondiendo a ningún patrón aparente. Los mejores resultados se obtuvieron en el tratamiento de PICL y TDZ combinados, en concentración de 10^{-9} M, con un 14% de abultamientos y un 9% de hojas. La combinación de la auxina NAA y la citoquinina BAP en concentración de 10^{-6} M también produjo buenos resultados (9% de hojas y un 5% de abultamientos), aumentando hasta un 45% de abultamientos si le añadimos la poliamina Spm (10^{-3} M).

En general, observamos cómo el *browning* o ennegrecimiento de los explantos esta presente en todas las experiencias, siendo más problemático con concentraciones elevadas de hormonas (10^{-3} M de Picloram, 2,4-D o KIN), donde se obtienen valores cercanos al 100%. De igual manera observamos efectos inhibitorios de ciertas concentraciones de hormonas en la inducción de respuestas organogénicas, como es el caso de la auxina Picloram (10^{-3} M), donde se obtuvieron un 0% de abultamientos y hojas. Igualmente ocurre con las citoquininas BAP (10^{-6} M), TDZ (10^{-4} M) y KIN (10^{-3} M), o con la combinación de ciertas auxinas y citoquininas, como en el tratamiento de NAA (10^{-6} M) + KIN (10^{-6} M), donde en ningún caso se indujeron respuestas organogénicas.

Aparentemente, los explantos responden de manera independiente a las hormonas empleadas (a excepción de ciertas concentraciones que resultan inhibitorias), mostrando incluso efectos similares en los tratamientos control, por lo que no podemos considerar ningún tratamiento como claramente más efectivo en la inducción de respuestas morfogénicas.

b) *Respuestas inducidas en función de los distintos explantos empleadas.*

La agrupación de los resultados en función de los diferentes tipos de explantos empleados, sin tener en cuenta el tratamiento hormonal del que proceden, reveló que la respuesta inducida en el cultivo *in vitro* dependió más de la naturaleza propia del explanto que de las hormonas añadidas al medio (Tabla III.15).

Tabla III.15. Índices (%) empleados para determinar la respuesta morfogénica *in vitro* en función de los diferentes tipos de explantos empleados, cultivados en medio PES y sin tener en cuenta las hormonas añadidas. Tiempo medio de cultivo: 30 días.

Tipo de explanto	n° explantos	INDICES (%)			
		<i>Browning</i>	Explantos verdes	Abultamiento/ callo	Regeneración hoja
RAM	70	85	15	0	0
SAM + RAM	23	24	76	0	2.7
SAM	238	53.43	46.5	4.29	8.4
APICE	119	73.9	26.7	1.79	1.49

Los fragmentos procedentes de la zona intermedia del cotiledón, correspondientes al SAM (*Shoot Apical Meristem*), son los que mayor porcentaje de regeneración de hojas presentan y mayor porcentaje de abultamientos. Esto se corresponde con la histología de la plántula realizada en el Capítulo I, ya que es la zona del cotiledón donde se encuentra el meristemo foliar. En la Fig. III.4 se muestran fotografías de varios explantos que han formado callos y/o abultamientos, y en la Fig. III.5 de explantos que han regenerado una hoja. Macroscópicamente observamos cómo los explantos, en ocasiones, forman una estructura abultada que podría ser una forma de crecimiento desorganizada a partir de la cual emerge una lámina foliar (Fig. III.4 y III.5). En la Fig. III.6 se muestra la histología de los callos y/o abultamientos, y microscópicamente observamos la existencia de un meristemo foliar, similar al SAM que vimos en la histología del Capítulo I. Las células por una parte desorganizadas y meristemáticas, se organizan formando estructuras de crecimiento tipo SAM, lo que probablemente luego va a desarrollar las hojas que hemos obtenido en cultivo *in vitro*.

Por otra parte, los explantos procedentes de la zona basal del cotiledón que incluyen en su estructura al meristemo radicular (RAM: *Root Apical Meristem*), son los que presentaron menor capacidad regenerativa (Tabla III.15). Estos explantos no produjeron raíces, ni abultamientos u hojas como el resto de explantos. Además, de forma general se realizaron subcultivos de los explantos que previamente habían generado una hoja en medio de inducción de raíces (10^{-6} M de IBA + TDZ, datos no mostrados), no obteniéndose raíces en ninguna ocasión.

III.4.1.2. Experiencias de cultivo *in vitro* llevadas a cabo en medio MS y aplicación de la técnica *Thin Cell Layer*.

En este set de experimentos se chequeó la reducción del tamaño del explanto y la adición o eliminación de la sal del medio MS. Los resultados demuestran que no se indujeron respuestas morfogenéticas diferentes a las obtenidas anteriormente, tanto con un tamaño de explanto menor, como con la eliminación o adición del NaCl (Tabla III.16).

Tabla III.16. Índices (%) empleados para determinar la respuesta morfogenética, 30 días después de la siembra, en los explantos *Thin Cell Layer* cultivados en medio MS suplementado o no con NaCl (3.20%) y hormonas (TDZ 0.5 μ M + NAA 5 μ M + Spm 1 μ M).

Tratamiento	n° explantos	INDICES (%)			
		<i>Browning</i>	Explantos verdes	Regeneración hoja	Explantos asépticos
MS	30	50	50	13.33	53.33
MS + Hormonas	30	66.66	33.33	13.33	73.33
MS + NaCl	30	66.66	33.33	0	33.33
MS + NaCl + Hormonas	30	80	20	0	33.33

Las respuestas organogénicas inducidas de regeneración de hojas (13.33%) se observan en este caso únicamente en los medios MS sin NaCl, independientemente de si llevaban hormonas o no. En general, el medio MS sin NaCl resultó ser más beneficioso en todos los parámetros medidos, tanto de regeneración de hojas, como de explantos verdes y mantenimiento de asepsia (máximo de 73% de explantos asépticos frente a un 33%).

III.4.1.3. Experiencias de cultivo *in vitro* llevadas a cabo con medio de cultivo MS y tratamiento del explanto para reducir el *browning* en cultivo.

En los apartados anteriores hemos visto como el *browning* esta presente de forma generalizada en todas las experiencias. En las Tablas III.17 y III.18 se observan los resultados obtenidos de las distintas experiencias llevadas a cabo con el objetivo de eliminar y/o reducir el *browning* de los explantos en cultivo. A pesar de los distintos tratamientos empleados (inmersión de los explantos en solución antioxidante de 100 mg l⁻¹ ác. ascórbico + ác. cítrico, y de su adición al medio de cultivo), permanece el

problema de ennegrecimiento de los explantos, tanto en las semillas y frutos en imbibición, como en las semillas ya germinadas. El porcentaje de *browning* fue cercano al 100% en la mayoría de explantos, excepto en los frutos (18%), en el SAM (55.5%), y en el RAM + SAM (33.3%). Por otra parte, la regeneración de hojas sólo se observó en los explantos maduros, y mayoritariamente en los explantos que incluían al meristemo foliar (SAM) (Tabla III.17), como ya ocurrió en las experiencias anteriores.

Explantos maduros

Tabla III.17. Índices (%) empleados para determinar la respuesta morfogénica *in vitro*, 30 días después de la siembra, en explantos maduros sembrados en medio MS + solución antioxidante (ác. ascórbico 100 mg l⁻¹ + ác. cítrico 100 mg l⁻¹) + 2,4-D 10⁻⁶ M.

Tipo de explanto	nº explantos	INDICES (%)			
		<i>Browning</i>	Explantos verdes	Regeneración hoja	Explantos asépticos
RAM + SAM	9	33.3	66.6	22.2	88.8
SAM	9	55.5	44.4	44.4	88.8
Ápices	9	100	0	0	100

Explantos inmaduros.

Tabla III.18. Índices (%) empleados para determinar la respuesta morfogénica *in vitro*, 30 días después de la siembra, en explantos inmaduros (semillas y frutos) sembrados en medio MS + solución antioxidante (ác. ascórbico 100 mg l⁻¹ + ác. cítrico 100 mg l⁻¹) + 2,4-D (10⁻⁴ M o 10⁻⁶ M).

	nº explantos	INDICES (%)			
		<i>Browning</i>	Explantos verdes	Regeneración hoja	Explantos asépticos
<i>Semillas 10 días en imbibición</i>					
MS + 2,4-D 10 ⁻⁴ M	45	93.33	6.66	0	97.77
MS + 2,4-D 10 ⁻⁶ M	29	86.2	13.79	0	89.65
<i>Semillas 2 días en imbibición</i>					
MS + 2,4-D 10 ⁻⁴ M	99	100	0	0	99
<i>Frutos</i>					
MS + 2,4-D 10 ⁻⁶ M	11	18	82	0	100

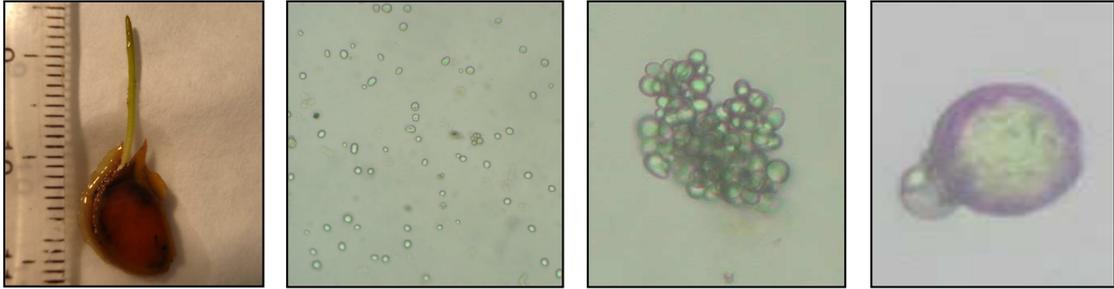
Por otra parte, los tratamientos de esterilización empleados (inmersión en solución acuosa de KBr al 2% y Triton al 1% durante 1 ó 10 minutos, según si los explantos eran maduros o inmaduros), y la eliminación del NaCl del medio de cultivo, resultaron ser aparentemente satisfactorios en lo que a los porcentajes de asepsia se refiere, ya que se mantuvieron cercanos al 100% en todas las experiencias.

III.4.2. Inducción de respuestas morfogenéticas in vitro (embriogénesis somática u organogénesis) a partir del cultivo celular. Inducción y mantenimiento de cultivos.

El tratamiento enzimático y la plasmolisis previa a la que fueron sometidos los explantos embrionarios de *Cymodocea nodosa* favorecieron la disgregación del tejido y la liberación de las células (Figs. III.7-III.11). Estas células fueron cultivadas a lo largo de tres meses de estudio en condiciones asépticas, lo que permitió su crecimiento y división durante todo el periodo de estudio. Las células liberadas del tejido embrionario, cultivadas durante 7 días en oscuridad y medio de cultivo MS suplementado con la auxina 2,4-D (10^{-4} M) y la citoquinina BAP (10^{-4} M), dieron lugar a células cilíndricas de gran tamaño (entre 150 y 300 μ M) (Fig. III.7B-E) y a procesos de división celular (Fig. III.7F). El número medio inicial de células pasó de $15 \pm 2,00$ a $48,66 \pm 7,00$ células por campo microscópico tras 7 días en cultivo.

Tras la primera fase de inducción, se eliminaron las hormonas y se añadió caseína hidrolizada y precursores de la embriogénesis somática (glutación oxidado y glutación reducido). Tras 2 semanas en cultivo, las células continuaron dividiéndose y formando agregados celulares (Fig. III.8). En la tercera semana se observaron, además de los agregados celulares y de numerosas células en división, algunas células globulares (Fig. III.9). A partir de la quinta semana, los cultivos fueron transferidos a condiciones de luz, observándose la presencia de células globulares pre-embriónicas (<1%) de gran tamaño (entre 100 y 200 μ M) (Fig. III.10). Aproximadamente a los dos meses y medio de haber iniciado el cultivo, estas células se transfirieron a placas de petri con mallas donde se desarrollaron diferentes estructuras de fijación (Fig. III.11).

III.5. DISCUSIÓN CAPÍTULO III



III.5.1. *Inducción de respuestas organogénicas (abultamientos/hojas) en explantos embrionarios de Cymodocea nodosa.*

La elección de un explanto apropiado constituye el primer paso para el establecimiento de los cultivos (Mroginski & Roca, 1991). El potencial organogénico de un explanto es inversamente proporcional a su edad fisiológica, es decir, cuanto más joven e indiferenciado es un explanto, mejor será su respuesta *in vitro* (Litz & Jarret, 1991). Además, el empleo de explantos provenientes de plantas jóvenes libres de patógenos que crecen en invernaderos, o el empleo de explantos provenientes de semillas germinadas en condiciones asépticas (Mroginski & Roca, 1991), permite disminuir la contaminación con microorganismos. Por ello, consideramos que el empleo de explantos embrionarios, provenientes de plántulas germinadas *in vitro* en condiciones asépticas, debe ser la mejor opción para llevar a cabo los experimentos de inducción de respuestas morfogenéticas *in vitro*, tanto de embriogénesis somática como de organogénesis, en comparación con otro tipo de material vegetal proveniente directamente de la naturaleza.

En la bibliografía consultada sobre plantas terrestres, observamos que es muy común el empleo de embriones inmaduros o semillas maduras para iniciar el cultivo de callos embriogénicos o para inducir respuestas morfogenéticas directamente del mismo explanto (Tapia *et al.*, 1999; Vikrant & Rashid, 2001; Khalil *et al.*, 2002; Li & Qu., 2002; Pateña *et al.*, 2002; Shohaël *et al.*, 2003, Vilchez *et al.*, 2002; Eudes *et al.*, 2003; Ma & Pulli, 2004; Desai *et al.*, 2004; Wu *et al.*, 2004; Xiao *et al.*, 2004; Tu *et al.*, 2005; Kaviraj *et al.*, 2006; Kumar *et al.*, 2007; Zhang *et al.*, 2007; etc.). Sin embargo, en fanerógamas marinas, debido posiblemente a las escasas experiencias de cultivo *in vitro*, únicamente se ha empleado como material vegetal de partida meristemas apicales de rizomas de plantas adultas obtenidos directamente de la naturaleza (Terrados, 1995 y García-Jiménez *et al.*, 2006 con la especie *Cymodocea nodosa*; Loques *et al.*, 1990, Meinesz *et al.*, 1991 y Balestri & Lardicci, 2006, con la especie *Posidonia oceanica*; Hamill & Sumb, 2002, con *Heterozostera tasmanica*; Koch & Durako, 1991 y Bird *et al.*, 1993, 1996 con la especie *Ruppia maritima*; Bird & Jewett-Smith, 1994, con la especie *Halophila engelmannii*). En otras ocasiones se han cultivado *in vitro* plántulas procedentes de semillas germinadas en el laboratorio, como en las especies *Thalassia testudinum* (Moffler & Durako, 1984; Durako & Moffler, 1987), *Halophila ovalis*, *Posidonia australis* y *Posidonia coriacea* (Wilson & Bennett, 2002), *Halophila*

decipiens (Bird *et al.*, 1998) y *Posidonia oceanica* (Balestri *et al.*, 1998; Balestri & Bertini, 2003). No obstante, no se conocen experimentos anteriores en fanerógamas marinas que hayan sido sustentados con explantos embrionarios procedentes de semillas germinadas *in vitro*, ni con semillas o plántulas procedentes de la naturaleza.

Por otra parte, los estudios de cultivo *in vitro* llevados a cabo en fanerógamas marinas no han tenido necesariamente como objetivo la inducción de respuestas morfogénicas (embriogénesis u organogénesis), sino la simple propagación vegetativa en condiciones controladas de laboratorio, así como el desarrollo de los medios de cultivo más apropiados para cada especie (agua de mar, nutrientes, vitaminas, fuentes de carbono, reguladores de crecimiento...). Las principales respuestas obtenidas han sido la producción de ramas, nudos, haces u hojas nuevas en cultivo, como vemos por ejemplo en los trabajos con fragmentos de rizoma de *Cymodocea nodosa* (Terrados, 1995; García-Jiménez *et al.*, 2006), de *Posidonia oceanica* (Loques *et al.*, 1990, Meinesz *et al.*, 1991), de *Heterozostera tasmanica* (Hamill & Sumb, 2002), de *Ruppia maritima* (Koch & Durako, 1991; Bird *et al.*, 1996), y de *Halophila engelmannii* (Bird & Jewett-Smith, 1994). En algunos casos se ha conseguido también aumentar el crecimiento del rizoma y la producción de raíces nuevas, como en las especies *Cymodocea nodosa* (Terrados, 1995) y *Posidonia oceanica* (Meinesz *et al.*, 1991; Balestri & Lardicci, 2006). En otras ocasiones, estos trabajos consiguen mantener los rizomas en cultivo durante largas temporadas, como por ejemplo Bird & Jewett-Smith (1994) con la especie *Halophila engelmannii*, cuyos rizomas se mantuvieron en cultivo durante 3 años subcultivándolos cada 5-12 semanas. Los rizomas de *Posidonia oceanica* también fueron mantenidos en cultivo desde varios meses (Balestri & Lardicci, 2006) hasta 2 años (Meinesz *et al.*, 1991).

El hecho de haber puesto a punto, en el primer capítulo de esta tesis, la técnica para germinar *in vitro* semillas recolectadas de la naturaleza, nos facilitó la disponibilidad de abundante material vegetal joven, con gran capacidad organogénica (debido a la presencia de un meristemo radicular y un meristemo foliar), y libre de patógenos externos con el que llevar a cabo los experimentos de cultivo. Así, tomamos como explanto la plántula recién germinada (cuando el cotiledón alcanza entre 2 y 5 cm de largo, y aún no ha desarrollado ni hojas ni raíces), la cual es esterilizada y fragmentada en segmentos de 5 mm. Denominamos entonces a los explantos en función de si contienen el meristemo apical (SAM), el meristemo radicular (RAM), ambos meristemos (SAM + RAM) o el ápice del cotiledón (ÁPICE) (Figs. III.1 y III.2). Por

otra parte, aplicamos sobre la plántula recién germinada la técnica de *Thin Cell Layer* (Nhut *et al.*, 2003), consistente en emplear delgadas capas de células (0.2-0.4 mm) para inducir la embriogénesis somática u organogénesis en el cultivo.

Inicialmente, asumimos que los explantos embrionarios poseen una potencialidad morfogenética que puede ser explotada para la producción masiva de embriones somáticos o para la inducción de respuestas organogenéticas. Efectivamente, esto se demostró en las experiencias de cultivo *in vitro*, ya que fueron capaces de iniciar programas organogenéticos consistentes en la formación de estructuras desorganizadas o abultamientos (Fig. III.4), que desembocaron en la formación de órganos foliares (Fig. III.5). Los cortes histológicos de estos abultamientos o callos (Fig. III.6), revelaron la existencia de células meristemáticas con un patrón estructural no definido (similar a las estructuras meristemáticas que vimos en la histología del Capítulo I), capaces de reorganizarse posteriormente para formar estructuras de crecimiento tipo SAM. Así, estas estructuras meristemáticas fueron las que evolucionaron durante el cultivo *in vitro* en la producción de hojas. Creemos, pues, que la respuesta organogenética inducida en los explantos embrionarios fue muy dependiente de la existencia previa de estos meristemas, que únicamente continuaron con el patrón de crecimiento establecido. Esto se demuestra cuando agrupamos los experimentos según el tipo de explanto empleado, sin tener en cuenta el tratamiento hormonal del que proceden (Tabla III.15). Observamos que los explantos que incluyen al SAM son los que mayor porcentaje de regeneración de hojas presentan (entre un 2 y un 8%) y mayor porcentaje de abultamientos (hasta un 4%). No ocurre lo mismo con los explantos que incluyen lo que consideramos el RAM, ya que claramente es el explanto con menos capacidad regenerativa. Así, ninguno de los explantos extraídos de la plántula generó raíces, ni los que inicialmente incluían el RAM, ni los que generaron abultamientos y hojas. Por lo tanto, a pesar de trabajar con explantos inicialmente apropiados para inducir respuestas morfogenéticas *in vitro*, no se ha podido modificar el patrón de crecimiento inicial del explanto. No obstante, la inducción de respuestas organogenéticas y el crecimiento de estos explantos en cultivo *in vitro*, nos demuestra su capacidad para permanecer con vida y ser cultivados en condiciones controladas de laboratorio. Así, creemos que será posible alterar los patrones de crecimiento, siempre que se encuentren las condiciones adecuadas para ello.

III.5.2. A pesar del empleo de diferentes medios de cultivo (PES y MS) no se ha conseguido modificar el patrón de crecimiento del explanto embrionario.

Nuestros primeros ensayos fueron realizados en medio de cultivo PES (Provasoli, 1968), debido a que es el medio empleado habitualmente en nuestro laboratorio, con resultados óptimos en el cultivo de distintas algas marinas que incluye en su composición el agua de mar, nutrientes y vitaminas. Además, en los antecedentes previos sobre el cultivo de *Cymodocea nodosa*, García Jiménez *et al.* (2006) lograron el mantenimiento y crecimiento de los meristemos apicales de rizomas empleando este mismo medio. Según el estudio de nutrición realizado por estos autores, la especie *C. nodosa* asimila mejor el N y el P en forma de amonio y dihidrógeno fosfato inorgánico, por lo que el medio de Provasoli inicial fue reformulado añadiendo NH_4Cl y KH_2PO_4 como fuentes de N y P. Además, adaptamos el medio al cultivo de explantos en placas, añadiendo las concentraciones más comunes que se observan en la bibliografía de agar (8 g l^{-1}) (empleado como agente gelificante) y de sacarosa (30 g l^{-1}) (empleada como fuente de carbono). Añadimos también L-Glutamina (100 mg l^{-1}), ya que en la bibliografía se considera importante la adición de aminoácidos como suplementos orgánicos, que pueden ser eficientes para inducir tanto la organogénesis como la embriogénesis somática y el desarrollo de los embriones (Miguel *et al.*, 2004; Wu *et al.*, 2004). En ciertos experimentos, añadimos igualmente el extracto extraído de la digestión del tejido de reserva de la semilla. Inicialmente, sosteníamos que podría suponer un enriquecimiento natural del medio de cultivo, muy beneficioso para la supervivencia y crecimiento de los explantos, al igual que tradicionalmente se ha usado el agua de coco para el cultivo de tejidos de diferentes especies terrestres (Krikorian, 1991).

Tradicionalmente, se ha empleado el medio MS o modificaciones del mismo para inducir las respuestas embriogénicas u organogénicas en cultivo de plantas terrestres (Radhakrishnan *et al.*, 2001; Li & Qu, 2002; Giridhar *et al.*, 2004; Martin & Madassery, 2005). Decidimos, por lo tanto, emplearlo también en nuestros cultivos, ya que estas plantas, a pesar de vivir en ambientes acuáticos, no son algas, sino fanerógamas marinas que evolucionaron de ancestros terrestres (Kuo & den Hartog, 2006). El medio MS fue formulado artificialmente con la adición de sales y vitaminas en agua bi-destilada, y suplementado con agar (8 g l^{-1}) como agente gelificante, sacarosa (30 g l^{-1}) como fuente de carbono, carbón activo (1 g l^{-1}) para la absorción de

metabolitos tóxicos, y hormonas para la inducción de respuestas morfogénéticas. En ciertos experimentos añadimos también NaCl al medio MS para simular las condiciones salinas y osmóticas del entorno natural de estas plantas ($1.028 \text{ Osmol Kg}^{-1}$).

Finalmente, las respuestas inducidas con ambos tipos de medios (MS y PES) resultaron ser similares, ya que **los explantos produjeron tanto hojas como abultamientos, independientemente del medio de cultivo empleado** (Tablas III.15-III.17). Además, no pareció afectarles la ausencia de sal, es más, pudo resultar beneficioso ya que se redujo la contaminación presente en los explantos, como veremos mas adelante.

En los trabajos de cultivo *in vitro* llevados a cabo con otras fanerógamas marinas, se han establecido y definido las condiciones nutritivas más adecuadas para su cultivo. Por ejemplo, Bird & Jewett-Smith (1994) determinaron que el medio más apropiado para el cultivo de rizomas de *Halophila engelmannii* era el medio f/4, basado en agua de mar y suplementado con nutrientes inorgánicos, sacarosa (1%), ácido glutámico como fuente de N (3.4 mM), y reguladores de crecimiento (NAA y BAP), sobre un substrato sólido de agar y carbón activo. Loques *et al.* (1990) observaron en su trabajo que el medio más apropiado para el cultivo de meristemas de *Posidonia oceanica* era el de Linsmaier & Skoog, también basado en agua de mar y suplementado con auxinas, citoquininas, sacarosa y agar. Los fragmentos de rizoma terminal de la especie *Ruppia maritima* se han propagado en medio con agua de mar artificial suplementada con $\frac{1}{2}$ MS y 1% sacarosa (Koch & Durako, 1991). Años más tarde, Bird *et al.* (1996) emplearon el medio f/2 de sales inorgánicas en agua de mar artificial, bicarbonato o sacarosa, para cultivar los segmentos apicales de *Ruppia maritima*. Con la especie *Heterozostera tasmanica*, Hamill & Sumb (2002) emplearon el medio de cultivo MS suplementado con sacarosa, BAP y baja concentración de antibióticos. En otras ocasiones, los cultivos se han mantenido en tanques, acuarios o recipientes con arena y agua de mar aireada y renovada de forma periódica, como en los trabajos de Meinesz *et al.* (1991) con la especie *Posidonia oceanica* o de Terrados (1995) con *Cymodocea nodosa*; en algunos trabajos el agua de mar fue enriquecida, además, con nutrientes de liberación lenta NPK (Balestri & Lardicci, 2006, con *Posidonia oceanica*).

III.5.3. *El empleo de diferentes combinaciones de hormonas (auxinas, citoquininas y poliaminas) tampoco afecta a la respuesta final de los explantos.*

El nivel de hormonas endógenas es considerado uno de los factores cruciales que determinan el potencial embriogénico de los explantos, tanto en la inducción como en la expresión de los embriones somáticos (Jiménez 2001, 2005). Se ha demostrado, en varias especies, que las células con capacidad regenerativa tienen mayores niveles endógenos de auxinas que las células no embriogénicas. Según Jiménez (2005), las hormonas añadidas exógenamente pueden modificar la concentración endógena de las mismas o interactuar con ellas, explicando en parte la regulación de la embriogénesis somática mediante el suplemento de hormonas o reguladores de crecimiento. Así, la respuesta final de los explantos va a depender del balance hormonal resultante entre las hormonas añadidas de forma exógena y las que posee el propio explanto. **En nuestro caso, a pesar de las múltiples combinaciones de hormonas y reguladores de crecimiento empleados (Tablas III.4 y III.5) y las potencialidades propias del explanto (que se manifiestan en su capacidad de regeneración *in vitro*), no se ha podido modificar el patrón de crecimiento inicial del explanto.**

Como vimos en el Capítulo I, el cotiledón posee un meristemo foliar o SAM, a partir del cual se desarrollan los haces foliares. En el cultivo *in vitro* de explantos embrionarios de *Cymodocea nodosa*, observamos que el único resultado obtenido es la regeneración de una hoja, tal y como estaba determinado en su patrón de crecimiento. Las diferentes combinaciones de hormonas empleadas no resultaron en ningún efecto concreto sobre los patrones de crecimiento de estos explantos (Tablas III.12-III.14). Observamos que los explantos que inicialmente presentaban mayor cantidad del tejido foliar, desarrollaron hojas en presencia y/o ausencia de hormonas. En aquellos medios control, sin presencia de hormonas (Tabla III.11), se obtuvieron un máximo del 19% de regeneración de hojas. Las auxinas empleadas (PICL, 2,4-D, IBA o NAA, con concentraciones entre 10^{-3} M y 10^{-9} M), indujeron respuestas de hasta un 25% de regeneración de hoja (en concreto 2,4-D 10^{-6} M) y un máximo de 9% de abultamientos (10^{-9} M de PICL). En algunos casos, se observaron efectos inhibitorios de las auxinas, como en el tratamiento de Picloram (10^{-3} M), donde se obtuvieron un 0% de abultamientos y hojas, y un 100% de explantos marrones (Tabla III.12).

En el caso de las citoquininas añadidas al medio de cultivo (TDZ, KIN o BAP, en concentraciones de 10^{-3} M a 10^{-9} M), los máximos porcentajes de regeneración de

hojas (14%) se dieron con 10^{-6} M de TDZ suplementado con extracto de semilla y un máximo de abultamientos del 7% con 10^{-9} M de TDZ. Observamos también un posible efecto inhibitorio de la hormona BAP (10^{-6} M) o del TDZ y KIN con concentraciones elevadas (10^{-4} M y 10^{-3} M respectivamente), ya que en estos casos no se obtuvieron respuestas organogénicas.

Cuando combinamos las auxinas, las citoquininas y las poliaminas, las respuestas fueron variadas, destacando de manera positiva la combinación de la auxina NAA y la citoquinina BAP en concentración de 10^{-6} M (9% de hojas y un 5% de abultamientos). Si a esta combinación se le añadían poliaminas (Spm 10^{-3} M), fue posible obtener hasta un 45% de abultamientos. El PICL y el TDZ combinados, en concentración de 10^{-9} M, también produjeron respuestas positivas, con un 14% de abultamientos y un 9% de hojas. Cuando las concentraciones se incrementaron a 10^{-6} M se produjeron solamente abultamientos (17%). Observamos igualmente un efecto inhibitorio en la combinación de algunas hormonas, como es el caso de NAA (10^{-6} M) + KIN (10^{-6} M), del 2,4-D (10^{-6} M) + KIN (10^{-6} M) + Spm y Put (10^{-3} M), o del TDZ (10^{-6} M) + Spm y Put (10^{-3} M).

En los trabajos previos de cultivo *in vitro* con otras fanerógamas marinas se han empleado hormonas para inducir el crecimiento de hojas, rizomas y raíces (ver Capítulo II). Los resultados han sido variados, aunque en ningún caso se indujeron respuestas morfogenéticas, de organogénesis o embriogénesis. Por ejemplo, Loques *et al.* (1990), observaron que los reguladores de crecimiento fueron indispensables para el establecimiento de los cultivos de macromeristemas de *Posidonia oceanica*, obteniéndose la mayor longevidad en medios suplementados con 0.2 mg l^{-1} IAA y 2 mg l^{-1} KIN. Bird & Jewett-Smith (1994) también emplearon la combinación de una auxina y una citoquinina para acelerar la propagación en *Halophila engelmannii* (0.25 mg l^{-1} NAA y 10 mg l^{-1} BAP). En *Ruppia maritima*, los rizomas apicales mostraron una estimulación del crecimiento en presencia de citoquininas (2iP y BA) (Bird *et al.*, 1996). Hamill & Sumb (2002) añadieron la citoquinina BAP en los medios de inducción de *Heterozostera tasmanica*. Balestri & Lardicci (2006) comprobaron que el uso de auxinas (5 mg l^{-1} IBA y NAA) fue indispensable para iniciar el desarrollo de raíces en fragmentos de rizoma de *Posidonia oceanica*. En los trabajos previos de inducción del crecimiento *in vitro* en fragmentos de rizoma de *Cymodocea nodosa* (Terrados, 1995; García-Jiménez *et al.*, 2006), fue el ácido giberélico la hormona que más eficazmente indujo el crecimiento de las hojas y las raíces. García-Jiménez *et al.*, (2006) obtuvieron

un 80% de regeneración de hojas en meristemos de *Cymodocea nodosa* cultivados en medios suplementados con TDZ. También en algunos trabajos se observaron efectos inhibitorios de las hormonas en el crecimiento de las fanerógamas marinas. La adición de la auxina NAA en cultivos de *Ruppia maritima* suprimió el desarrollo de las raíces (Koch & Durako, 1991), al igual que la auxina IBA parecía tener un efecto inhibitorio en el crecimiento de fragmentos de *C. nodosa* (García-Jiménez *et al.*, 2006).

Debemos incidir en que la regeneración de la hoja no era el objetivo inicial del cultivo *in vitro*, ni la solución al problema planteado, ya que la germinación de semillas ya permite la obtención de una plántula completa. Nuestro objetivo era la obtención de múltiples embriones somáticos o callos a partir de un único explanto para optimizar la técnica de propagación desarrollada. Dada la escasa respuesta obtenida en este trabajo en los medios de inducción con hormonas, la imposibilidad de modificar el patrón de crecimiento del explanto y la importancia del contenido endógeno de hormonas, consideramos que sería conveniente en un futuro estudiar los niveles y los tipos de hormonas endógenas presentes en estos explantos, y cómo interaccionan con las hormonas añadidas, para poder inducir finalmente las respuestas morfogénicas deseadas.

III.5.4. Los problemas asociados al cultivo *in vitro*: el ennegrecimiento o *browning* de los explantos y la contaminación presente en los cultivos conducen finalmente a la muerte del explanto.

La oxidación de los polifenoles provoca el *browning* de los tejidos cultivados *in vitro* (Dalal *et al.*, 2004). Este fenómeno disminuye la regeneración de muchas especies leñosas y recalcitrantes. En la literatura consultada se citan diversas estrategias para solucionar o paliar los efectos nocivos del *browning*. El carbón activo (entre 0.1 y 5%) suele ser incorporado a los medios, dado que es probable que absorba metabolitos tóxicos para los cultivos (Loskutov *et al.*, 1999). Otra de las fórmulas más ampliamente aceptadas para disminuir el *browning* es la incorporación de agentes antioxidantes al medio (L-cisteína, ácido ascórbico, ácido cítrico), que retienen fenoles previniendo su oxidación (Panaia *et al.*, 2000; Prakash *et al.*, 2006). El ácido cítrico se comporta como un agente quelante, reteniendo los iones metálicos que son necesarios para que las enzimas oxidativas comiencen su actividad (Panaia *et al.*, 2000). El ácido ascórbico, además, provee a las células una defensa contra los daños oxidativos, incrementa su

actividad metabólica y acelera la liberación de azúcares para mejorar el crecimiento y desarrollo (Prakash *et al.*, 2006). En otras ocasiones es útil también usar estas soluciones antioxidantes durante la preparación del explanto (Panaia *et al.*, 2000; Thimmappaiah *et al.*, 2002; Vengadesan *et al.*, 2003; Wu & du Toit, 2004). Además, reducir el contacto con el oxígeno reduce la oxidación de los fenoles (Panaia *et al.*, 2000). Otra práctica que elimina fenoles o reduce su acumulación, es la adición al medio de agentes quelantes como el PVP (polivinilpirrolidona) (Ahmed *et al.*, 2001). La exposición a bajos niveles de irradiación u oscuridad durante las primeras fases de crecimiento disminuye también la oxidación y aumenta la supervivencia de los explantos (Thimmappaiah *et al.*, 2002; Dalal *et al.*, 2004). Igualmente, las bajas temperaturas previenen el *browning* y la exudación de fenoles (Dalal *et al.*, 2004). Otra forma de disminuir los efectos nocivos de la oxidación de polifenoles es reducir el intervalo de tiempo entre subcultivos, impidiendo así su acumulación (Romano *et al.*, 2002; Dalal *et al.*, 2004; Prakash *et al.*, 2006).

En nuestro caso, hemos empleado de forma rutinaria el carbón activo y una solución antioxidante (ácido ascórbico + ácido cítrico), tanto en el medio de cultivo como en el pretratamiento de incubación de los explantos (*dipping*). No obstante, aunque se retrasa la aparición del ennegrecimiento, los métodos convencionales empleados no parecen haberlo solucionado en su totalidad (Tablas III.17 y III.18). Varios estudios muestran que las fanerógamas marinas producen normalmente ácidos fenólicos en defensa frente a los herbívoros, o para evitar el fouling o la competición por el espacio (Vergeer *et al.*, 1995; Wisespongpanand *et al.*, 2005). Por lo tanto, un estudio más exhaustivo sobre la producción de fenoles en cultivo *in vitro* sería necesario para poder solucionar este problema en un futuro.

La contaminación interna es un problema para el establecimiento de los cultivos que puede minimizarse o eliminarse usando antibióticos en el medio de cultivo o con pretratamientos previos de inmersión de los explantos en soluciones antibióticas (Chen & Yeh). En *Cymodocea nodosa* se han establecido cultivos axénicos con meristemos apicales de rizoma terminal mediante la incubación de los explantos durante 48 horas en una solución de antibióticos conteniendo 150 mg l⁻¹ de rifampicina, penicilina, nistatina y ampicilina, y 5 mg l⁻¹ de dióxido de germanio (García Jiménez *et al.*, 2006). Koch & Durako (1991) establecieron cultivos axénicos con la especie *Ruppia maritima*, realizando igualmente un pretratamiento de los explantos con solución fungicida, hipoclorito de sodio e incubación en solución de antibióticos durante 20 horas

(eritromicina y rifampicina fueron los más efectivos). Años más tarde, Bird *et al.* (1996) esterilizaron los rizomas de *R. maritima* agitándolos durante 1 min en agua destilada y 1% de jabón líquido, 10 min en agua de mar esterilizada e hipoclorito sódico (0.5%), y 48 horas en agua de mar estéril conteniendo una solución fungicida y antibacteriana de Benomyl (1 g l^{-1}), y de eritromicina, kanamicina y rifampicina (250 mg l^{-1} respectivamente). Hamill & Sumb (2002) observaron que una excesiva esterilización del explanto en la especie *Heterozostera tasmanica* provocaba el *browning* y la muerte del tejido, por lo que aconsejaron una esterilización suave basada en la inmersión durante 1 min en hipoclorito sódico comercial (0.25%), seguido de inmersión en solución de PPM (solución comercial antimicrobiana) al 4% durante 30 min y toda la noche en agua de mar estéril. Loques *et al.* (1990) probaron varios tratamientos con desinfectantes en explantos de *Posidonia oceanica*, y observaron resultados positivos en etanol al 75% (10 min), benlate 6 g l^{-1} (5 min) y $\text{Ca}(\text{ClO})_2$ 10 ó 70 g l^{-1} (20 min).

En nuestro caso, hemos esterilizado las plántulas sumergiéndolas 10 minutos en hipoclorito de sodio comercial al 10% con agua de mar esterilizada y una gota de Tween 80 como agente tensoactivo (Ailstock *et al.*, 1991), y hemos mantenido relativamente estériles los medios de cultivo mediante la adición de 10 ml l^{-1} de solución de antibióticos en el medio de cultivo (según García Jiménez *et al.*, 2006) y mediante *dipping* de los explantos durante 24-48 horas en esta misma solución de antibióticos. Hemos empleado, además, otro tipo de esterilización, consistente en sumergir las plántulas durante 10 min en hipoclorito de sodio comercial al 10% con agua de mar esterilizada y una gota de Tween, seguido de una inmersión del explanto durante 1 ó 10 min en una solución acuosa de KBr y Triton. En general, los cultivos se mantuvieron estériles varios días, contaminándose con el tiempo debido probablemente a la microflora interna asociada al propio explanto. La ausencia de NaCl del medio de cultivo MS hace que disminuyan los contaminantes asociados a los explantos (Tabla III.16), por lo que **creemos que se trata de contaminantes sistémicos y de naturaleza halófila**. Además, puede ser que esta serie de contaminantes influyan en la respuesta de los explantos a los reguladores de crecimiento, ya que pueden alterar la composición química del medio de cultivo. La eliminación de la sal permite mantener estériles los explantos durante más tiempo sin afectar la supervivencia de los mismos.

Las mismas conclusiones parecen derivarse de los cultivos celulares, cuyas experiencias preliminares, llevadas a cabo en medio de cultivo PES disuelto en agua de mar (datos no mostrados), revelaron que a pesar de emplear material vegetal joven y

germinado a partir de semillas en el laboratorio, no se obtuvieron cultivos asépticos, y la elevada contaminación presente en las placas conducía finalmente a la muerte de las células. Las experiencias posteriores en medio de cultivo MS disuelto en agua destilada eliminaron la contaminación inicial, consiguiendo que las células se mantuvieran asépticas, se dividieran y permanecieran con vida durante un periodo de más de 90 días. **Por lo tanto, para el cultivo de explantos o células, se recomienda la eliminación del NaCl durante las primeras fases de cultivo, y una adaptación paulatina a las condiciones salinas del entorno natural de esta planta.**

III.5.5. *La inducción y el mantenimiento de los cultivos celulares abren una nueva y esperanzadora línea de investigación que promete ser la solución al problema.*

Diversos trabajos con fanerógamas marinas han establecido previamente los protocolos para el aislamiento de protoplastos en las especies *Zostera marina* (Mazzella *et al.*, 1981), *Posidonia oceanica* (Balestri & Cinelli, 1992; 2001; Carpaneto *et al.*, 2004), *Cymodocea nodosa* (Balestri & Cinelli, 2001) y *Zostera muelleri* (Garril *et al.*, 1994). En el protocolo establecido para la obtención de protoplastos de *C. nodosa* y *P. oceanica*, Balestri & Cinelli (2001) emplearon como material vegetal de partida haces recolectados de una pradera natural. Llevaron a cabo el aislamiento de los protoplastos incubando la parte basal de las hojas jóvenes en una combinación de celulasa, hemicelulasa y pectinasa, empleando en todo momento agua de mar. Tras la purificación y el aislamiento de los protoplastos, se cultivaron en agua de mar suplementada con los nutrientes del medio MS, sacarosa (3%), CaCl₂ (10 mM) y albúmina sérica bovina (2%). Observaron una mayor viabilidad de los protoplastos de *Posidonia*, que generaban la pared celular en 7 días, y en algunos de ellos se formaban estructuras callosas a los 20-30 días. Sin embargo, no pudieron continuar el crecimiento de estos protoplastos, debido a la contaminación fúngica de los medios.

El establecimiento del cultivo celular y la inducción de las primeras fases de la embriogénesis somática en *Cymodocea nodosa* se ha conseguido empleando como material vegetal de partida plántulas germinadas en condiciones axénicas (Fig. III.1). Las plántulas se cortaron en fragmentos de 1 mm y se sumergieron durante 1 minuto en etanol al 70% y durante 30 minutos en hipoclorito sódico (2%). La digestión enzimática se llevó a cabo incubando los explantos en oscuridad, 36°C y agitación (50 rpm) durante

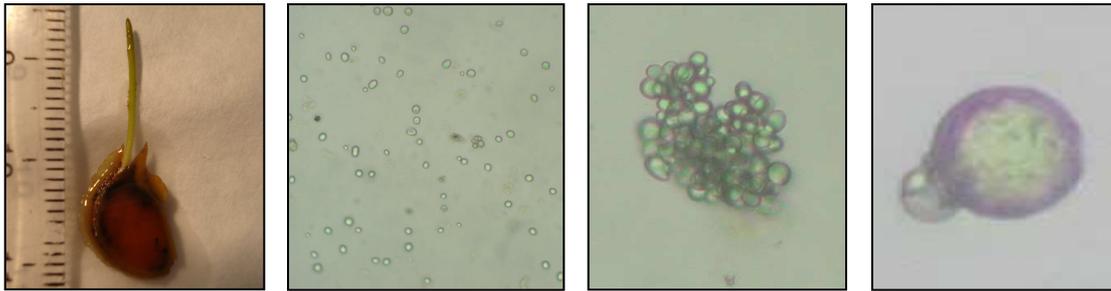
18 h en medio de plasmolisis (Tabla III.10) conteniendo las enzimas celulasa y hemicelulasa. Las células recuperadas mediante filtración y centrifugación, se sembraron en oscuridad y medio de cultivo MS (Tablas III.6-III.8), suplementado con las hormonas 2,4-D y BAP en concentración de 10^{-4} M. Una semana después, se obtuvieron células cilíndricas de gran tamaño (entre 150 y 300 μ M) (Fig. III.7B-E) y células en división (Fig. III.7F). Tras esta primera fase de inducción, se eliminaron las hormonas y se añadió caseína hidrolizada y precursores de la embriogénesis somática (glutatió oxidado y glutatió reducido), lo que originó la formación de agregados celulares (Fig. III.8) y células globulares (Fig. III.9). A partir de la quinta semana, los cultivos fueron transferidos a condiciones de luz, y en la séptima semana de cultivo se observaron células globulares pre-embriónicas (<1%), de entre 100 y 200 μ M (Fig. III.10). Gracias a la eliminación de la sal del medio de cultivo hemos evitado la contaminación presente en experiencias preliminares, manteniendo las placas asépticas durante todo el estudio. Este hecho ha permitido, por otra parte, inducir la división y el crecimiento de las células a lo largo de tres meses, multiplicando en un 300% el número inicial de células tras siete días en cultivo (el número medio de células pasó de $15 \pm 2,00$ a $48,66 \pm 7,00$ cs/campo microscópico).

Las células de *Cymodocea nodosa* se han dividido y han crecido en cultivo *in vitro*, conformando a lo largo de los distintos periodos de cultivo los estadios iniciales de la embriogénesis somática, semejantes a los descritos en la bibliografía. El procedimiento básico se expone en el esquema de la Fig. III.12. En la primera fase de la embriogénesis somática, consistente en la inducción de los embriones somáticos, se emplean normalmente altas concentraciones de hormonas (generalmente de auxina 2,4-D), y las células somáticas adquieren características embriónicas por medio de una completa reorganización del estado celular, que incluye fisiológico, metabólico y de expresión génica (Jiménez, 2005). En nuestro caso hemos empleado las hormonas 2,4-D y BAP en alta concentración (10^{-4} M), ya que según la literatura consultada, la unión de una auxina y una citoquinina suele aumentar la frecuencia de embriogénesis somática. En concreto, la unión de 2,4-D y BAP induce la embriogénesis somática en diversas especies como *Oryza* sp. (Sahasrabudhe *et al.*, 2000), *Cynodon dactylon* x *Cynodon transvaalensis* (Li & Qu, 2002), *Acacia sinuata* (Vengadesan *et al.*, 2002), *Pinus pinaster* (Miguel *et al.*, 2004), *Digitaria sanguinalis* (Bui *et al.*, 1998), *Hordeum vulgare*, *Triticum aestivum*, *T. durum*, *T. monococcum*, *T. urartu*, *Secale cereale*, *Avena sativa* (Eudes *et al.*, 2003) y *Pinus bungeana* (Zhang *et al.*, 2007), entre otras.

A continuación las células fueron subcultivadas en medios sin hormonas, necesarios para que las células se diferencien en embriones somáticos (Jiménez, 2005). Además, los medios fueron enriquecidos con precursores de la embriogénesis somática (glutación oxidado y reducido), y suplementados con un aporte extra de nitrógeno y aminoácidos en forma de caseína hidrolizada. En muchos trabajos es frecuente la adición de **caseína hidrolizada** en los medios de inducción en concentraciones que suelen variar entre 0.1 y 1.5 g l⁻¹ (por ejemplo: Mariani *et al.*, 2000 con *Oryza sativa*; Sata *et al.*, 2000 con *Allium sativum*; Iraqi & Tremblay, 2001 con *Picea mariana* y *Picea glauca*; Shohael *et al.*, 2003 con *Zea mays*; Ipekci & Gozukirmizi, 2003 con *Paulownia elongata*; Zhang *et al.*, 2007 con *Pinus bungeana*). En algunos trabajos se ha demostrado que la adición de esta sustancia acompañada de L-glutamina incrementa significativamente el número de embriones cigóticos que producen embriones somáticos (Miguel *et al.*, 2004, con *Pinus pinaster*). El **glutación oxidado** (GSSG) y su forma **reducida** (GSH) aumentan la producción y la calidad de los embriones somáticos en ciertas especies como *Picea glauca* (Belmonte *et al.*, 2003, 2005a, 2005b). Según Belmonte *et al.* (2003), el balance entre GSH y GSSH o el ratio GSH:GSSH, puede correlacionarse con el crecimiento de tejido embrionario. La aplicación de GSH o GSSG durante la maduración, altera la morfología de los embriones en desarrollo y parece que afecta a la sensibilidad del tejido al ABA (Stasolla & Yeung, 2003).

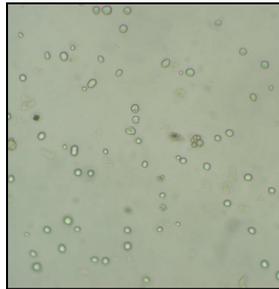
La digestión del tejido embrionario de plántulas de *Cymodocea nodosa* germinadas *in vitro* y el establecimiento de los cultivos celulares en condiciones asépticas supone una herramienta nueva y fundamental para el futuro del cultivo *in vitro* de esta especie, ya que establece las bases necesarias para ensayar nuevas técnicas y protocolos de regeneración. La técnica propuesta en este estudio debe completarse con el desarrollo de vías morfogenéticas que permitan inducir la formación de plantas completas a partir de embriones somáticos obtenidos en cultivo *in vitro*.

III.6. CONCLUSIÓN CAPÍTULO III



- 1) El explanto embrionario obtenido a partir de semillas germinadas en condiciones axénicas, es capaz de iniciar programas organogénéticos *in vitro* consistentes en la formación de estructuras desorganizadas o abultamientos que desembocan en la formación de órganos foliares.
- 2) A pesar de emplear distintos medios de cultivo (MS y PES) y múltiples combinaciones de hormonas, las respuestas organogénicas inducidas en todos los casos son similares (producción de hojas y abultamientos), independientemente del tratamiento empleado. Creemos que la respuesta inducida está muy influenciada por la presencia previa de meristemos foliares (SAM) en los explantos, que continúan con el patrón de crecimiento establecido.
- 3) Uno de los problemas asociados al cultivo es el ennegrecimiento o *browning* de los explantos. Los métodos convencionales que hemos empleado (adición al medio MS de carbón activo y de una solución antioxidante de ácido ascórbico y ácido cítrico, al igual que la inmersión de los explantos en esta misma solución antioxidante), únicamente retrasan su aparición.
- 4) Otro problema asociado al cultivo *in vitro* de *Cymodocea nodosa* es la presencia de contaminantes sistémicos y de naturaleza halófila, que pueden reducirse eliminando del medio de cultivo el NaCl. Así, se recomienda su eliminación durante las primeras fases de cultivo, y una adaptación progresiva a las condiciones salinas del entorno natural de esta planta.
- 5) La digestión enzimática de los explantos embrionarios de *Cymodocea nodosa* libera células, que, cultivadas en medios suplementados con hormonas, se dividen y producen cultivos celulares estables y asepticos que evolucionan hasta la formación (minoritaria) de formas pre-embrionarias. El protocolo desarrollado supone una herramienta nueva y fundamental para el futuro del cultivo *in vitro* de *Cymodocea nodosa*, ya que permite el mantenimiento de cultivos celulares con los que ensayar nuevas técnicas y protocolos de regeneración.

III.7. BIBLIOGRAFÍA CAPÍTULO III



Abdullah, R., Cocking, E.C., Thompson, J.A., 1986. Efficient plant regeneration from rice protoplasts through somatic embryogenesis. *Bio/Technology* 4, 1087-1090.

Ahmed, M.F., Kantharajah, A.S., Holford, P., 2001. Factors affecting adventitious shoot and root formation from the avocado cultivar 'Hass' (*Persea americana*, Mill.) in vitro. *Gartenbauwissenschaft*, 66(6), 293–297.

Ailstock, M.S., Fleming, W.J, Cooke, T.J. 1991. The characterization of axenic culture systems suitable for plant propagation and experimental studies of the submersed aquatic angiosperm *Potamogeton pectinatus* (Sago Pondweed). *Estuaries* 14(1), 57-64.

Attree, S.M., Moore, D., Sawhney, V.K., Fowke, L.C., 1991. Enhanced maturation and desiccation tolerance of white spruce [*Picea glauca* (Moench) Voss] somatic embryos: effects of a non-plasmolysing water stress and abscisic acid. *Annals of Botany* 68, 519-525.

Azpeitia, A., Chan, J.L., Sáenz, L., Oropeza, C., 2003. Effect of 22(S),23(S)-homobrassinolide on somatic embryogenesis in plumule explants of *Cocos nucifera* L. cultured in vitro. *The Journal of Horticultural Science and Biotechnology* 78, 591-596.

Balestri, E., Cinelli, F., 1992. Isolation of protoplast from the seagrass *Posidonia oceanica* (L.) Delile. *Aquatic Botany* 43, 301-304.

Balestri, E., Piazzzi, L., Cinelli, F., 1998. In vitro germination and seedling development of *Posidonia oceanica*. *Aquatic Botany* 60, 83-93.

Balestri, E., Cinelli, F., 2001. Isolation and cell wall regeneration of protoplast from *Posidonia oceanica* and *Cymodocea nodosa*. *Aquatic Botany* 70, 237-242.

Balestri, E., Bertini, S., 2003. Growth and development of *Posidonia oceanica* seedling treated with plant growth regulators: possible implications for meadow restoration. *Aquatic Botany* 76, 291-297.

Balestri, E., Lardicci, C., 2006. Stimulation of root formation in *Posidonia oceanica* cuttings by application of auxins (NAA and IBA). *Marine Biology* 149, 393-400.

Bekele, E., Klock, G., Zimmermann, U., 1995. Somatic embryogenesis and plant regeneration from leaf and root explants and from seeds of *Eragrostis tef* (gramineae). *Hereditas* 123(2), 183-189.

Bell, L., Trigiano, R., Conger, B., 1993. Relationship of abscisic acid to somatic embryogenesis in *Dactylis glomerata*. *Environmental and Experimental Botany* 33, 495-499.

Belmonte, M., Stasolla, C., Loukanina, N., Yeung, E.C., Thorpe, T.A., 2003. Glutathione modulation of purine metabolism in cultured white spruce embryogenic tissue. *Plant Science* 165(6), 1377-1385(9).

Belmonte, M., Stasolla, C., Katahira, R., Loukanina, N., Yeung, E.C., Thorpe, T.A., 2005a. Glutathione-induced growth of embryogenic tissue of white spruce correlates with changes in pyrimidine nucleotide metabolism. *Plant Science* 168(3), 803-812.

Belmonte, M., Donald, G., Reid, D.M., Yeung, E.C., Stasolla, C., 2005b. Alterations of the glutathione redox state improve apical meristem structure and somatic embryo quality in white spruce. *Journal of Experimental Botany* 56, 2355-2364.

Bird, K.T., Cody, B.R., Jewett-Smith, J., Kane, M.E., 1993. Salinity effects on *Ruppia maritima* L. cultured in vitro. *Botanica Marina* 36, 23-28.

Bird, K.T., Jewett-Smith, J., 1994. Development of a medium and culture system for in vitro propagation of the seagrass *Halophila engelmannii*. *Canadian Journal of Botany* 72, 1503-1510.

Bird, K.T., Jewett-Smith, J., Fonseca, M.S., 1994. Use of in vitro–propagated *Ruppia maritima* for sea meadow restoration. *Journal of Coastal Research* 10, 732-737.

Bird, K.T., Brown, M.S., Henderson, T.T., O'Hara, C.E., Robbie, J.M., 1996. Culture studies of *Ruppia maritima* L. in bicarbonate and sucrose based media. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 199, 153-164.

Bird, K.T., Johnson, J.R., Jewett-Smith, J., 1998. In vitro culture of the seagrass *Halophila decipiens*. *Aquatic Botany* 60, 377-387.

Bui, V.L., Jeanneau, M., Nghieng-Thao, D.M., Vidal, J., Tran Thanh Van, K., 1998. Rapid regeneration of whole plants in large crabgrass (*Digitaria sanguinalis* L.) using thin cell layer culture. *Plant Cell Reports* 18, 166-172.

Bui, V.L., Nhut, D.T., Tran Thanh Van, K., 1999. Plant production via shoot regeneration from thin cell layer pseudo-bulblet explants of *Lilium longiflorum* in vitro. *Comptes Rendus de l'Académie des Sciences, Paris* 322, 303-310.

Cangahuala-Inocente, G.C., Dal Vesco, L.L., Steinmacher, D., Torres, A.C., Guerra, M.P., 2007. Improvements in somatic embryogenesis protocol in Feijoa (*Acca sellowiana* (Berg) Burret): induction, conversion and synthetic seeds. *Scientia Horticulturae* 111, 228-234.

Carpaneto, A., Naso, A., Paganetto, A., Cornara, L., Pesce, E.R., Gambale, F., 2004. Properties of ion channels in the protoplast of the Mediterranean seagrass *Posidonia oceanica*. *Plant, Cell and Environment* 27, 279-292.

Chen, W.L., Yeh, D.M., 2007. Elimination of in vitro contamination, shoot multiplication, and ex vitro rooting of *Aglaonema*. *HortScience* 42(3), 629-632.

Chu, C.C., Wang, C.C., Sun, C.S., Hsu, C., Yin, K.C., Chu, C.Y., Bi, F.Y., 1975. Establishment of an efficient medium for anther culture of rice through comparative experiments on the nitrogen sources. *Science Sinica* 18, 659-668.

Cucco, M.F., Rossi Jaume, A.D., 2000. Protocol for regeneration in vitro of *Arachis hypogaea* L. *Electronic Journal of Biotechnology* 3(2).

Dalal, M.A., Das, B., Rather, M.A., Bilal, S., 2004. Effect of media additives, incubation culture conditions and subculturing on control of oxidative browning in in-vitro culture of apple (*Malus domestica*). *Indian Journal of Agricultural Science* 74(11), 600-603.

Desai, N.S., Suprasanna, P., Bapat, V.A., 2004. Simple and reproducible protocol for direct somatic embryogenesis from cultured immature inflorescence segments of sugarcane (*Saccharum* spp.). *Current Science* 87(6), 764-768.

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. *American Journal of Botany* 74, 234-240.

Estabrooks, T., Browne, R., Dong, Z., 2007. 2,4,5-Trichlorophenoxyacetic acid promotes somatic embryogenesis in the rose cultivar 'Livin' Easy (*Rosa* sp.). *Plant Cell Reports* 26(2), 153-160.

Eudes, F., Acharya, S., Laroche, A., Selinger, L.B., Cheng, K.J., 2003. A novel method to induce direct somatic embryogenesis, secondary embryogenesis and regeneration of fertile green cereal plants. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 73(2), 147-157.

Fernandez, S., Michaux-Ferriere, N., Coumans, M., 1999. The embryogenic response of immature embryo cultures of durum wheat (*Triticum durum* Desf.): histology and improvement by AgNO₃. *Plant Growth Regulation* 28(3), 147-155.

Gaj, M.D., 2004. Factors influencing somatic embryogenesis induction and plant regeneration with particular reference to *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. *Plant Growth Regulation* 43(1), 27-47.

Gamborg, O., Miller, R., Ojima, K., 1968. Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. *Experimental Cell Research* 50, 151.

García-Jiménez, P., Navarro, P.E., Santana, C.H., Luque, A., Robaina, R.R., 2006. Anatomical and nutritional requirements for induction and sustained growth in vitro of *Cymodocea nodosa* (Ucria) Ascherson. *Aquatic Botany* 84, 79-84.

Garril, A., Tyerman, S.D., Findlay, G.F., 1994. Ion channels in the plasma membrane of protoplasts from the halophytic angiosperm *Zostera muelleri*. *Journal of Membrane Biology* 42, 381-393.

Gendy, C., Séne, M., Bui, V.L., Vidal, J., Van Tran Thanh, K., 1996. Somatic embryogenesis and plant regeneration in *Sorghum bicolor* (L.) Moench. *Plant Cell Reports* 15(12), 900-904.

Giridhar, P., Indu, E.P., Vinod, K., Chandrashekar, A., Ravishankar, G.A., 2004. Direct somatic embryogenesis from *Coffea arabica* L. and *Coffea canephora* P. ex. Fr. under the influence of ethylene action inhibitor-silver nitrate. *Acta Physiologiae Plantarum* 26(3), 299-305.

Godbole, S., Sood, A., Thakur, R., Sharma, M., Ahuja, P.S., 2002. Somatic embryogenesis and its conversion into plantlets in a multipurpose bamboo, *Dendrocalamus hamiltonii* Nees et Arn. Ex Munro. *Current Science* 83(7), 885-889.

Grando, M.F., Franklin, C.I., Shatters, R.G., 2002. Optimizing embryogenic callus production and plant regeneration from 'Tifton 9' bahiagrass seed explants for genetic manipulation. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 71(3), 213-222.

Hamill, J., Sumbly, J., 2002. In vitro culture of *Heterozostera tasmanica* and *Zostera muelleri*. The Western Port Sea Grass Seminar, Hastings, Victoria, Australia. 29th November 2002. pp. 5.

Hatanaka, T., Sawabe, E., Azuma, T., Uehida, N., Yasuda, T., 1995. The role of ethylene in somatic embryogenesis from leaf discs of *Coffea canephora*. *Plant Science* 107(2), 199-204.

Héller, R., 1953. Researches on the mineral nutrition of plant tissues. *Annales des Sciences Naturelles. Botanique et Biologie Végétale*, 11th Ser. 14, 1-223.

Hernández Gil, R. 2002. Libro Botánica On Line. <http://www.forest.ula.ve/~rubenhg/>.

Herve, P., Jauneau, A., Paques, M., Marien, J.N., Boudet, A.M., Teulieres, C., 2001. A procedure for shoot organogenesis in vitro from leaves and nodes of an elite *Eucalyptus gunnii* clone: comparative histology. *Plant Science* 161(4), 645-653.

Iantcheva, A., Vlahova, M., Bakalova, E., Kondorosi, E., Elliott, M.C., Atanassov, A., 1999. Regeneration of diploid annual medics via direct somatic embryogenesis promoted by thidiazuron and benzylaminopurine. *Plant Cell Reports* 18(11), 904-910.

Ipekci, Z., Gozukirmizi, N., 2003. Direct somatic embryogenesis and synthetic seed production from *Paulownia elongate*. *Plant Cell Reports* 22(1), 16-24.

Iraqi, I., Tremblay, F.M., 2001. The role of sucrose during maturation of black spruce (*Picea mariana*) and white spruce (*Picea glauca*) somatic embryos. *Physiologia Plantarum* 111(3), 381-388.

Jimenez, V.M., 2001. Regulation of in vitro somatic embryogenesis with emphasis on the role of endogenous hormones. *Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal* 13(2), 196-223.

Jimenez, V.M., 2005. Involvement of plant hormone and plant growth regulators on in vitro somatic embryogenesis. *Plant Growth Regulation* 47, 91-110.

Kaviraj, C.P., Kiran, G., Venugopal, R.B., Kavi Kishor, P.B., Rao, S., 2006. Somatic embryogenesis and plant regeneration from cotyledonary explants of green gram (*Vigna radiata* (L.) Wilezek.)- a recalcitrant grain legume. *In Vitro Cellular and Developmental Biology Plant* 42(2), 134-138.

Kevers, C., Gaspar, T., Dommès, J., 2002. The beneficial role of different auxins and polyamines at successive stages of somatic embryo formation and development of *Panax ginseng* in vitro. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 70(2), 181-188.

- Khalil, S., Cheah, K., Perez, E., Gaskill, D., Hu, J., 2002. Regeneration of banana (*Musa spp.* ABB cv. Dwarf Brazilian) via secondary somatic embryogenesis. *Plant Cell Reports* 20, 1128-1134.
- Koch, E.W., Durako, M.J., 1991. In vitro studies of the submerged angiosperm *Ruppia maritima*: auxin and cytokinin effects on plant growth and development. *Marine Biology* 110(1), 1-6.
- Krikorian, A.D., 1991. Medios de cultivo: generalidades, composición y preparación. Capítulo 3. In: *Cultivo de tejidos en la agricultura: fundamentos y aplicaciones*. Roca, W.M., Mroginski, L.A., (Eds). Cali, Colombia. P.xii, 970. CIAT (Centro Internacional de Agricultura Tropical). pp. 41-70.
- Kumar, V., Ramakrishna, A., Ravishankar, G.A., 2007. Influence of different ethylene inhibitors on somatic embryogenesis and secondary embryogenesis from *Coffea canephora* P ex Fr. *In Vitro Cellular and Developmental Biology Plant* 43(6), 602-607.
- Kuo, J., den Hartog, C., 2006. Seagrass morphology, anatomy, and ultrastructure. In: *Seagrasses: Biology, Ecology and Conservation*. Larkum, A.W.D., Orth, R.J., Duarte, C.M., (Eds). Netherlands, Springer Verlag. pp. 51-87.
- Li, X.Y., Huang, F.H., Gbur, E.E., 1997. Polyethylene glycol-promoted development of somatic embryos in loblolly pine (*Pinus taeda* L.). *In Vitro Cellular and Developmental Biology Plant* 33(3), 184-189.
- Li, L., Qu, R., 2002. In vitro somatic embryogenesis in turf-type bermudagrass: roles of abscisic acid and gibberellic acid, and occurrence of secondary somatic embryogenesis. *Plant Breeding* 121, 155-158.
- Linsmaier, E.F., Skoog, F., 1965. Organic growth factor requirements of tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum* 18, 100-127.
- Little, E.L., Maghanua, Z.V., Parrott, W.A., 2000. A protocol for repetitive somatic embryogenesis from mature peanut epicotyls. *Plant Cell Reports* 19, 351-357.
- Litz, R.E., Jarret, R.L., 1991. Regeneración de plantas en el cultivo de tejidos: embriogénesis somática y organogénesis. Capítulo 7. In: *Cultivo de tejidos en la agricultura: fundamentos y*

aplicaciones. Roca, W.M., Mroginski, L.A., (Eds). Cali, Colombia. P.xii, 970. CIAT (Centro Internacional de Agricultura Tropical). pp. 143-172

Loquès, F., Caye, G., Meinesz, A., 1990. Axenic culture of selected tissue of *Posidonia oceanica*. Aquatic Botany 37(2), 171-188.

Loskutov, A.V., Beninger, C.W., Ball, T.M., Hosfield, G.L., Nair, M., Sink, K.C., 1999. Optimization of in vitro conditions for stigma-like-structure production from half-ovary explants of *Crocus sativus* L. In Vitro Cellular and Developmental Biology Plant 35(3), 200-205.

Ma, R., Pulli, S., 2004. Factors influencing somatic embryogenesis and regeneration ability in somatic tissue culture of spring and winter rye. Agricultural and Food Science 13, 363-377.

Mandal, A.K.A., Gupta, S.D., 2002. Direct somatic embryogenesis of safflower: a scanning electron microscopic study. Current science 83(9), 1138-1140.

Marcano, A.K., Guevara, P.M., Oropeza, M., García, E., 2002. Optimización del proceso de embriogénesis somática en variedades venezolanas de caña de azúcar. Acta Científica Venezolana 53(4), 251-257.

Mariani, T.S., Miyake, H., Takeoka, Y., 2000. Improvement of direct somatic embryogenesis in rice by selecting the optimal developmental stage of explant and applying desiccation treatment. Plant Production Science 3(2), 114-123.

Martin, K.P., Madasser, Y.J., 2005. Direct and indirect somatic embryogenesis on cotyledon explants of *Quassia amara* L., an antileukaemic drug plant. In Vitro Cellular and Developmental Biology Plant 41(1), 54-57.

Mazzella, L., Mauzerall, D., Lyman, H., Alberte, R.S., 1981. Protoplast isolation and photosynthetic characteristics of *Zostera marina* L. (Eel Grass). Botanica Marina 24, 285-289.

Medina, R.D., Faloci, M.M., Solis Neffa, V., Mroginski, L.A., 2003. Embriogénesis somática y regeneración de plantas de mandioca (*Manihot esculenta* Crantz) de cultivares de interés para Argentina. RIA 32(3), 143-160.

Meinesz, A., Caye, G., Loquès, F., Molenaar, H., 1991. Growth and development in culture of orthotropic rhizomes of *Posidonia oceanica*. Aquatic Botany 39(3-4), 367-377.

Mendoza, M.G., Kaeppler, H.F., 2002. Auxin and sugar effects on callus induction and plant regeneration frequencies from mature embryos of wheat (*Triticum aestivum* L.). *In Vitro Cellular and Development Biology Plant* 38(1), 39-45.

Miguel, C., Gonçalves, S., Tereso, S., Marum, L., Oliveira, M.M., 2004. SE from 20 open-pollinated seed families of Portuguese plus trees of maritime pine. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 76, 121-130.

Moffler, M.D., Durako, M.J., 1984. Axenic culture of *Thalassia testudinum* Banks ex König (Hydrocharitaceae). *American Journal of Botany* 71, 1455-1460.

Monteiro, M., Kevers, C., Dommès, J., Gaspar, Th., 2002. A specific role for spermidine in the initiation phase of somatic embryogenesis in *Panax ginseng* CA Meyer. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 68, 225-232.

Mroginski, L.A., Roca, W.M., 1991. Establecimiento de cultivos de tejidos vegetales in vitro. Capítulo 2. In: *Cultivo de tejidos en la agricultura: fundamentos y aplicaciones*. Roca, W.M., Mroginski, L.A., (Eds). Cali, Colombia. P.xii, 970. CIAT (Centro Internacional de Agricultura Tropical). pp.19-40.

Mroginski, L.A., Sansberro, P., Flaschland, E., 2004. Establecimiento de cultivos de tejidos vegetales. Capítulo 2. In: *Biología y Mejoramiento Vegetal*. Echenique, V., Rubinstein, C., Mroginski, L.A., (Eds). Ediciones Instituto Nacional Tecnología Agropecuaria. pp. 35-42.

Müller, A.J., Grafe, R., 1978. Isolation and characterization of cell lines of *Nicotiana tabacum* lacking nitrate reductase. *Molecular and General Genetics* 161, 67-76.

Murashige, T., Skoog, F., 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum* 15(3), 473-497.

Nhut, D.T., Tran Thanh Van, K., Van Le, B., Thorpe, T.T.A. 2003. Thin cell layer culture system: regeneration and transformation applications. Kluwer Academic Publisher. pp. 530.

Nishiwaki, M., Fujino, K., Koda, Y., Masuda, K., Kikuta, Y., 2000. Somatic embryogenesis induced by the simple application of abscisic acid to carrot (*Daucus carota* L.) seedlings in culture. *Planta* 211(5), 756-759.

- Panaia, M., Senaratna, T., Bunn, E., Dixon, K.W., Sivasithamparam, K., 2000. Micropropagation of the critically endangered Western Australian species, *Symonanthus bancroftii* (F. Muell.) L. Haegi (Solanaceae). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 63(1), 23-29.
- Park, S.Y., Shin, K.S., Paek, K.Y., 2006. Increased ethylene and decreased phenolic compounds stimulate somatic embryo regeneration in leaf thin section cultures of *Doritaenopsis* hybrid. *Journal of Plant Biology* 49(5), 358-363.
- Parrott, W.A., Bailey, M.A., 1993. Characterization of recurrent somatic embryogenesis of alfalfa on auxin-free medium. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 32, 69-76.
- Pateña, L.F., Carlos-Refuerzo, L.R., Barba, R.C., 2002. Somatic embriogénesis and plantlet regeneration in Mango (*Mangifera indica* L.). *In Vitro Cellular and Developmental Biology Plant* 38, 173–177.
- Patnaik, J., Sahoo, S., Debata, B.K., 1997. Somatic embryogenesis and plantlet regeneration from cell suspension cultures of palmarosa grass (*Cymbopogon martini*). *Plant Cell Reports* 16(6), 430-434.
- Perez-Nuñez, M.T., Chan, J.L., Saenz, L., Gonzalez, T., Verdeil, J.L., Oropeza, C., 2006. Improved somatic embryogenesis from *Cocos nucifera* (L.) plumule explants. *In Vitro Cellular and Developmental Biology Plant* 42(1), 37-43.
- Pliego-Alfaro, F., Monsalud, M.J.R., Litz, R.E., Gray, D.J., Moon, P.A., 1996. Effects of abscisic acid, osmolarity and partial desiccation on the development of recalcitrant mango somatic embryos. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 44(1), 63-70.
- Prakash, E., Sha Valli Khan, P.S., Sreenivasa Rao, T.J.V., Meru, E.S., 2006. Micropropagation of red sanders (*Pterocarpus santalinus* L.) using mature nodal explants. *Journal of Forest Research* 11(5), 329-335.
- Provasoli, L., 1968. Media and prospects for cultivation of marine algae. In: *Cultures and Collections of Algae*. Watanabe, A., Hattori, A., (Eds). Japanese Society of Plant Physiology, Tokyo. pp. 47-74.
- Pullman, G.S., Namjoshi, K., Zhang, Y., 2003a. Somatic embryogenesis in loblolly pine (*Pinus taeda* L.): improving culture initiation with abscisic acid, silver nitrate, and cytokinin adjustments. *Plant Cell Reports* 22, 85-95.

Pullman, G.S., Zhang, Y., Phan, B., 2003b. Brassinolide improves embryogenic tissue initiation in conifers and rice. *Plant Cell Reports* 22, 96-104.

Pullman, G.S., Mein, J., Johnson, S., Zhang, Y., 2005. Gibberellin inhibitors improve embryogenic tissue initiation in conifers. *Plant Cell Reports* 23, 596-605

Pullman, G.S., Skryabina, A., 2007. Liquid medium and liquid overlays improve embryogenic tissue initiation in conifers. *Plant Cell Reports* 26(7), 873-887.

Qureshi, J.A., Saxena, P.K., 1992. Adventitious shoot induction and somatic embryogenesis with intact seedlings of several hybrid seed geranium (*Pelargonium* × *hortorum* Bailey) varieties. *Plant Cell Reports* 11(9), 443-448.

Radhakrishnan, T., Murthy, T.G.K., Chandran, K., Bandyopadhyav, A., 2001. Somatic embryogenesis in *Arachis hypogaea*: revisited. *Australian Journal of Botany* 49(6), 753-759.

Raemakers, C.J., Jacobsen, E., Visser, R.G.F., 1995. Secondary somatic embryogenesis and applications in plant breeding. *Euphytica* 81, 93-107.

Ramarosandratana, A.V., van Staden, J., 2004. Effects of auxins. and 2,3,5- triodobenoic acid on somatic embryo initiation from Norway spruce zygotic embryos (*Picea abies*). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 79(1), 105-107.

Rogers, S.M.D., Beech, J., Sarma, K.S., 1998. Shoot regeneration and plant acclimatization of the wetland monocot Cattail (*Typha latifolia*). *Plant Cell Reports* 18, 71–75.

Romano, A., Barros, S., Martins-Loucao, M.A., 2002. Micropropagation of the Mediterranean tree *Ceratonia siliqua*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 68(1) 35-41.

Sahasrabudhe, N.A., Nandi, M., Bahulikar, R.A., Rao, P.S., Suprasanna, P., 2000. A two step approach to scale up regeneration through somatic embryogenesis from in vitro cultures immature inflorescences of a male sterile line and a maintainer line of rice. *Journal of New Seeds* 2, 1-10.

Sakhanokho, H.F., Ozias-Akins, P., Lloyd-May, O., Chee, P.W., 2005. Putrescine enhances somatic embryogenesis and plant regeneration in upland cotton *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 81(1), 91-95.

Samantaray, S., Rout, G.R., Das, P., 1997. Regeneration of plants via somatic embryogenesis from leaf base and leaf tip segments of *Echinochloa colona*. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 47(2) 119-125.

Sarma, K.S., Rogers, S.M.D., 1998. Plant regeneration and multiplication of the emergent wetland monocot *Juncus accuminatus*. Plant Cell Reports 17(8), 656-660.

Sarma, K.S., Rogers, S.M.D., 2000. Plant regeneration from seedling explants of *Juncus effusus*. Aquatic Botany 68(3), 239-247.

Sata, S.J., Bagatharia, S.B., Tharker, V.S., 2000. Induction of direct somatic embryogenesis in garlic (*Allium sativum*). Methods in Cell Science 22(4), 299-304.

Schenk, R.U., Hildebrandt, A.C., 1972. Medium and techniques for induction and growth of monocotyledonous and dicotyledonous plant cell cultures. Canadian Journal of Botany 50, 199-204.

Shohael, A.M., Akanda, M.A.L., Parvez, S., Mahfuja, S., Alam, M.F., Islam, R., Joarder, N., 2003. Somatic embryogenesis and plant regeneration from immature embryo derived callus of inbred Maize (*Zea mays* L.). Biotechnology 2(2), 154-161.

Slater, A., Scott, N., Fowler, M., 2003. Plant tissue culture. Chapter 2. In: Plant Biotechnology: The genetic manipulation of plants. Slater, A., Scott, N., Fowler, M., (Eds). Oxford University Press, USA. pp. 37-53.

Stasolla, C., Loukanina, N., Ashihara, H., Yeung, E.C., Thorpe, T.A., 2001. Purine and pyrimidine metabolism during the partial drying treatment of white spruce (*Picea glauca*) somatic embryos. Physiologia Plantarum 111, 93-101.

Stasolla, C., Yeung, E.C., 2003. Recent advances in conifer embryogenesis: improving somatic embryo quality. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 74, 15-35.

Tang, W., Newton, R.J., 2004. Increase of polyphenol oxidase and decrease of polyamines correlate with tissue browning in Virginia pine (*Pinus virginiana* Mill) Plant Science 167(3), 621-628.

Tapia, R., Castillo, R., Nieves, N., Blanco, M., González, J., Sánchez, M., Rodríguez, Y., 1999. Inducción, maduración y encapsulación de embriones somáticos de caña de azúcar (*Saccharum* sp.) Var Cp 5243. *Biotecnología Aplicada* 16(1),20–23.

Terrados, J., 1995. Effects of some plant growth regulators on the growth of the seagrass *Cymodocea nodosa* (Ucria) Ascherson. *Aquatic Botany* 51(3), 311-318.

Thimmappaiah, G.T., Puthra, S., Raichal, A., 2002. In vitro grafting of cashew. (*Anacardium occidentale* L.). *Scientia Horticulture* 92(2), 177-182.

Tokuji, Y., Kuriyama, K., 2003. Involvement of gibberellin and cytokinin in the formation of embryogenic cell clumps in carrot (*Daucus carota*). *Journal Plant Physiology* 160, 133-141.

Trick, H.N., Finer, J.J., 1999. Induction of somatic embryogenesis and genetic transformation of Ohio Buckeye (*Aesculus glabra* Willd.). *In Vitro Cellular and Developmental Biology Plant* 35, 57-60.

Tu, S., Sangwan, R.S, Sangwan-Norreel, B.S., 2005. Improved efficiency of somatic embryogenesis from zygotic embryos in *Hyoscyamus niger* by seed water-soaking. *Scientia Horticulturae* 106 (3), 440-445.

Turhan, H., Baser, I., 2004. Callus induction from mature embryo of winter wheat (*Triticum aestivum* L.). *Asian Journal Plant Science* 3, 17-19.

Varisai Mohamed, S., Wang, C.S., Thiruvengadam, M., Jayabalan, N., 2004. In vitro plant regeneration via somatic embryogenesis through cell suspension cultures of horsegram (*Macrotyloma uniflorum* (La.)Verdc.). *In Vitro Cellular and Development Biology Plant* 40(3), 284-289(6).

Vengadesan, G., Ganapathi, A., Ramesh Anbazhagan, V., Prem Anand, R., 2002. Somatic embryogenesis in cell suspension cultures of *Acacia sinuata* (Lour.) Merr. *In Vitro Cellular and Developmental Biology Plant* 38(1), 52-57.

Vengadesan, G., Ganapathi, A., Prem Anand, R., Selvaraj, N., 2003. In vitro propagation of *Acacia sinuata* (Lour.) Merr. from nodal. segments of 10-year-old tree. *In Vitro Cellular and Developmental Biology Plant* 39, 409-414.

Venkatachalam, P., Geetha, N., Khandelwal, A., Shaila, M.S., Lakshmi Sita, G., 1999. Induction of direct somatic embryogenesis and plant regeneration from mature cotyledon explants of *Arachis hypogaea* L. *Current Science* 77, 269-273.

Vergeer, L.H.T., Aarts, T.L., De Groot, J.D., 1995. The 'wasting disease' and the effect of abiotic factors (light intensity, temperature, salinity) and infection with *Labyrinthula zosterae* on the phenolic content of *Zostera marina* shoots. *Aquatic Botany* 52 (1-2), 35-44.

Vikrant, Rashid, A., 2001. Direct as well as indirect somatic embryogenesis from immature (unemerged) inflorescence of a minor millet *Paspalum scrobiculatum* L. *Euphytica* 120(2), 167-172.

Vikrant, Rashid, A., 2002. Induction of multiple shoots by thidiazuron from caryopsis cultures of minor millet (*Paspalum scrobiculatum* L.) and its effect on the regeneration of embryogenic callus cultures. *Plant Cell Reports* 21(1), 9-13.

Vikrant, Rashid, A., 2003. Somatic embryogenesis from mesocotyl and leaf-base segments of *Paspalum scrobiculatum* L., a minor millet. *In Vitro Cellular and Developmental Biology Plant* 39(5), 485-489.

Vilchez, J.A., Albano, N.R., Gomez Kosky, R., García, L., 2002. Inducción de embriogénesis somática en *Psidium guajava* L. a partir de embriones cigóticos. *Revista de la Facultad de Agronomía (LUZ)* 19, 284-293.

Vooková, B., Matúšová, R., Kormuťák, A., 2003. Secondary somatic embryogenesis in *Abies numidica*. *Biologia Plantarum* 46(4), 513-517.

Wang, J., Seliskar, D.M., Gallagher, J.L., 2003. Tissue culture and plant regeneration of *Spartina alterniflora*: implications for wetland restoration. *Wetlands* 23(2) 386-393.

Wang, J., Seliskar, D.M., Gallagher, J.L., 2004. Plant regeneration via embryogenesis in the brackish wetland monocot *Scirpus robustus*. *Aquatic Botany* 79, 163-174.

Weast, R.C., Astle, M.J., 1981. *CRC Handbook of chemistry and physics: A ready reference book of chemical and physical data*. Boca Raton, Florida : CRC Press.

White, R.P., 1963. *The cultivation of animal and plant cells*. Ronald Press, New York. pp. 228.

Wilson, J.G., Bennett, I.J., 2002. In vitro propagation of western Australian seagrasses. Western Port Sea Grass Seminar, Hastings, Victoria, Australia on 29th November 2002

Wispongpan, P., Srisombat, T., Patarajinda, S., Aryuttaka, C., 2005. Chemical defenses of seagrasses. The Proceedings of 43rd Kasasart University Annual Conference. Subject: Fisheries. p. 283.

Wu, H.C., Du Toit, E.S., 2004. Reducing oxidative browning during in vitro establishment of *Protea cynaroides*. *Scientia Horticulturae* 100(1-4), 355-358.

Wu, J., Zhang, X., Nie, Y., Jin, S., Liang, S., 2004. Factors affecting somatic embryogenesis and plant regeneration from a range of recalcitrant genotypes of chinese cottons (*Gossypium hirsutum* L.). *In Vitro Cellular and Developmental Biology Plant* 40(4), 371-375.

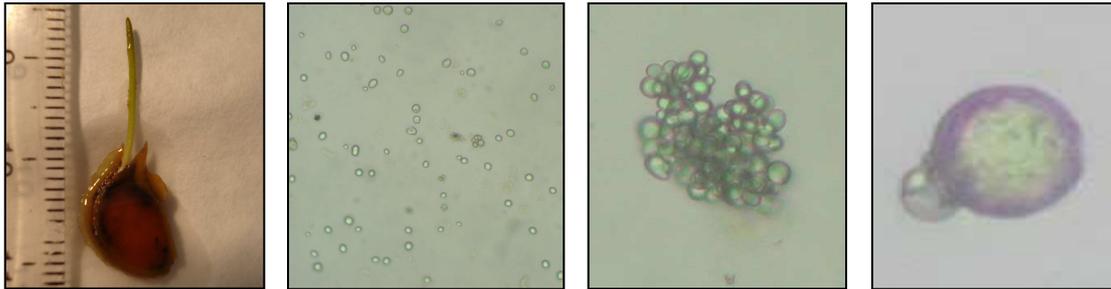
Xiao, J.N., Huang, X.L., Wu, Y.J., Li, X.J., Zhou, M.D., Engelmann, F., 2004. Direct somatic embryogenesis induced from cotyledons of mango immature zygotic embryos. *In Vitro Cellular and Developmental Biology Plant* 40(2), 196-199.

Yong-Eui, Ch., Jae-Whune, K., Eui-Soo, Y., 1999. High frequency of plant production via somatic embryogenesis from callus or cell suspension cultures in *Eleutherococcus senticosus*. *Annals of Botany* 83, 309-314.

Zhang, B-H., Feng, R., Liu, F., Wang, Q., 2001. High frequency somatic embryogenesis and plant regeneration of an elite Chinese cotton variety. *Botanical Bulletin of Academia Sinica* 42, 9-16.

Zhang, C.X., Li, Q., Kong, L., 2007. Induction, development and maturation of somatic embryos in Bunge's pine (*Pinus bungeana* Zucc. ex Endl). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 91(3), 273-280.

III.8. ANEXO CAPÍTULO III



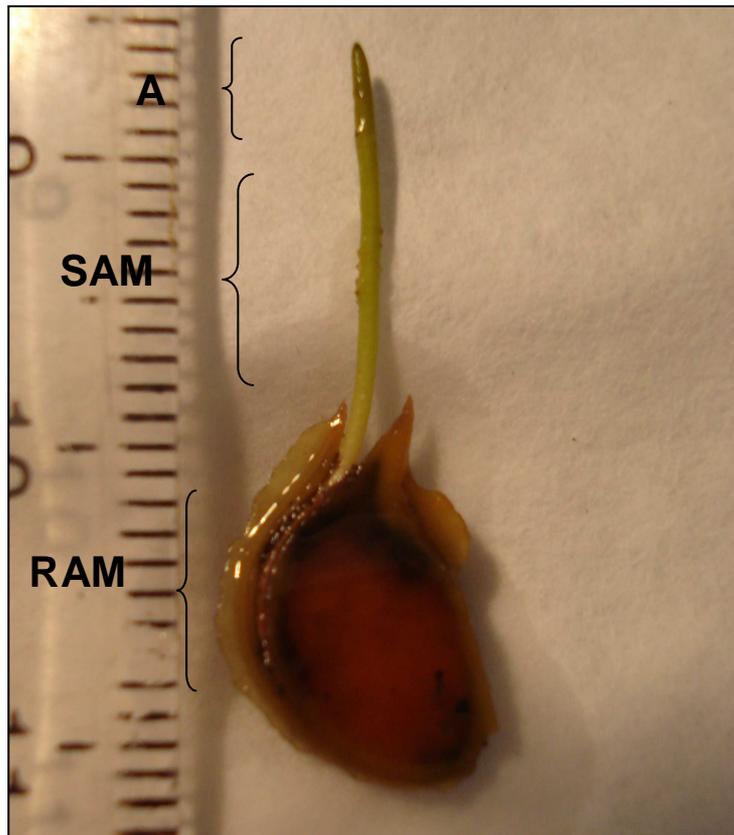


Fig. III.1. Plántula a los 15 días tras la germinación. Detallados los tres tipos de explantos empleados para el cultivo *in vitro*. A: Ápice; SAM: *Shoot Apical Meristem*; RAM: *Root Apical Meristem*.

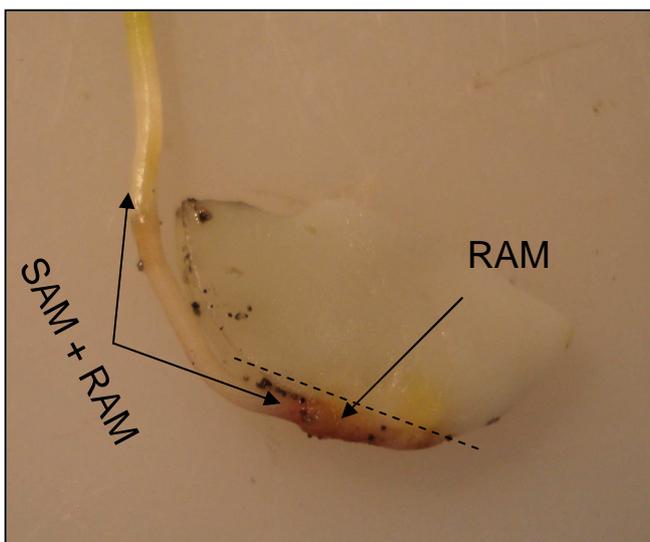


Fig. III.2. Plántula sin cubierta externa. Detalle de explantos: SAM+RAM y RAM. La línea de puntos indica el lugar por donde cortamos para eliminar el hipocotilo adherido al cotiledón.



Fig. III.3. Explantos embrionarios sembrados en placa de petri.



Fig. III.4 . Explantos embrionarios de *Cymodocea nodosa* (5-8 mm) que han producido diferentes tipos de abultamientos y/o callos.



Fig. III.5. Explantos embrionarios de *Cymodocea nodosa* (5-8 mm) regenerando una hoja.

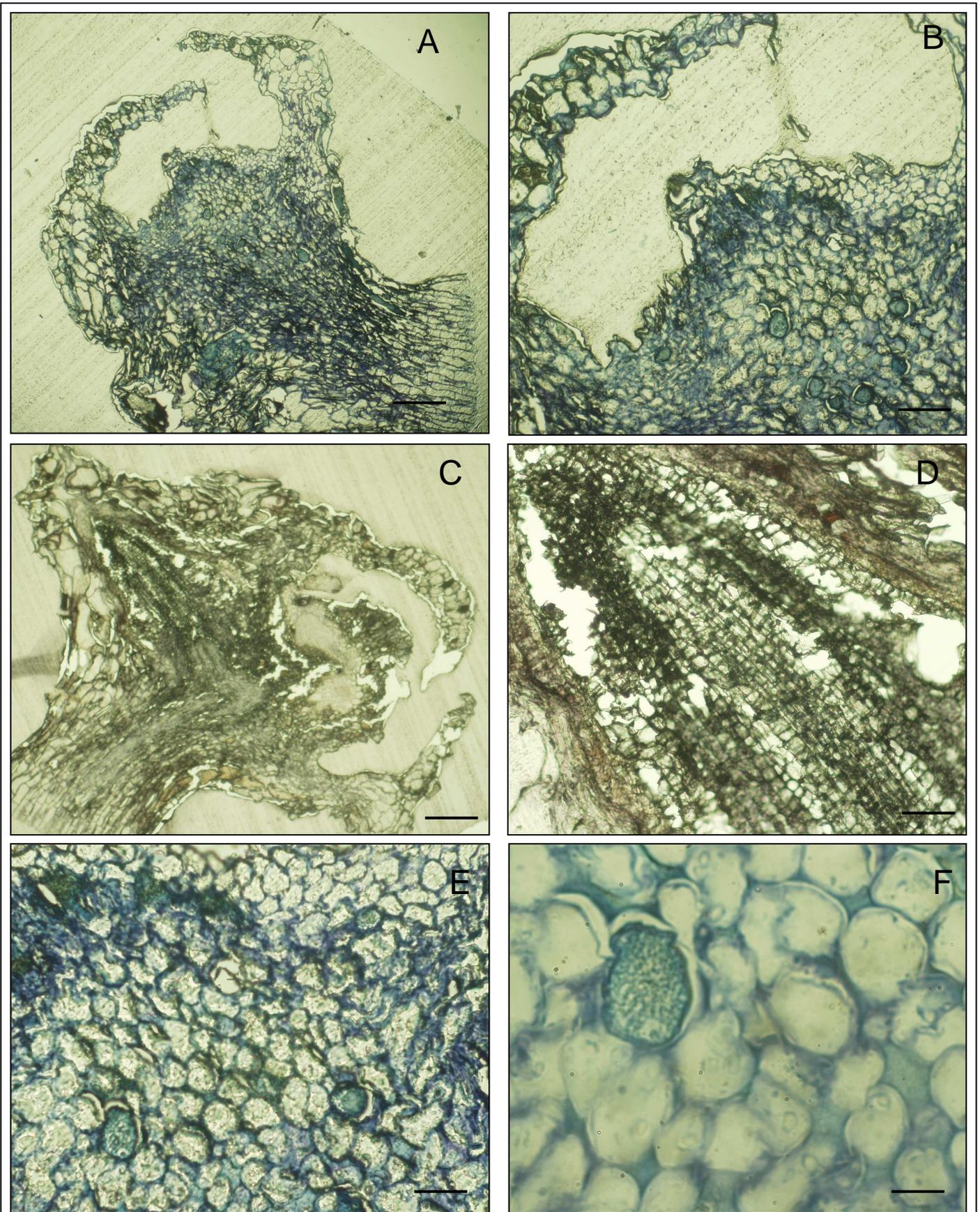


Fig. III.6. A-F. Histología de los abultamientos de *Cymodocea nodosa* (Barras = A: 0.1 cm; B: 365 μ M; C: 0.1 cm; D: 180 μ M; E: 190 μ M; F: 95 μ M).

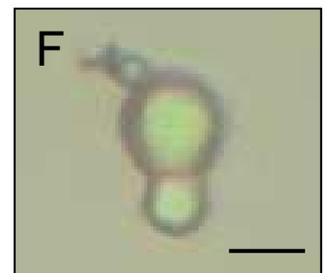
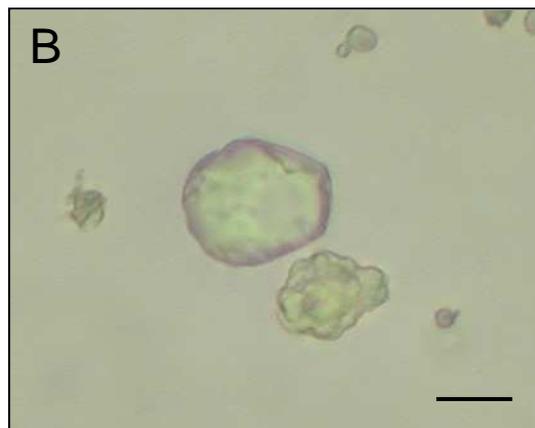
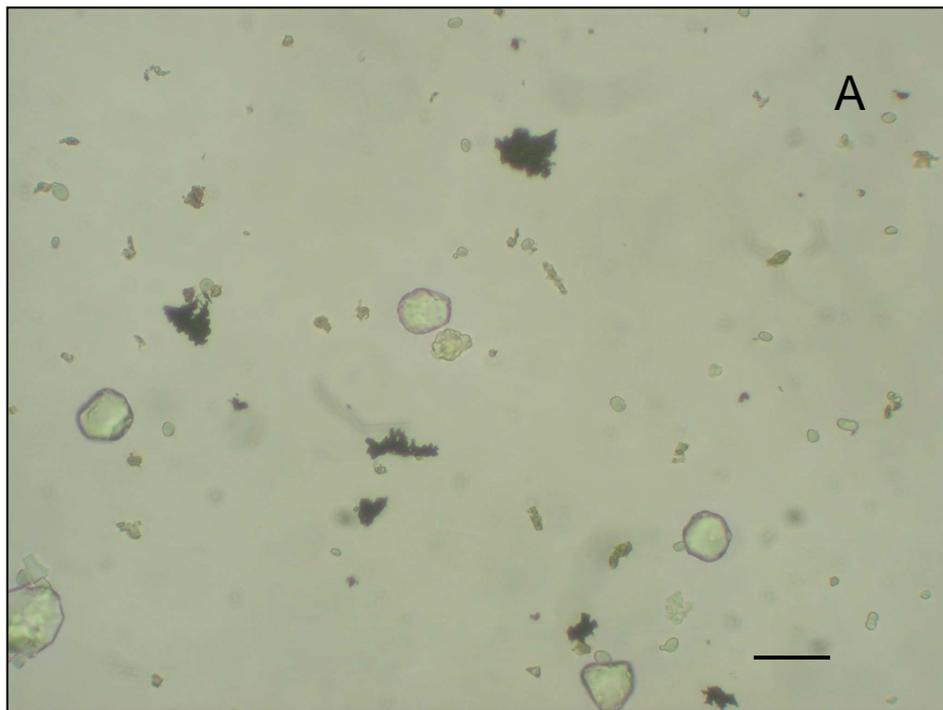


Fig. III.7. A-F. Cultivo celular de *Cymodocea nodosa* tras una semana en oscuridad y medio base MS suplementado con hormonas (10^{-4} M de 2,4-D y BAP). B-E. Células cilíndricas de gran tamaño. F. Célula en división. Barras = A: 208 μ M; B: 73.5 μ M; C: 108 μ M; D: 138 μ M; E: 170 μ M; F: 30 μ M.

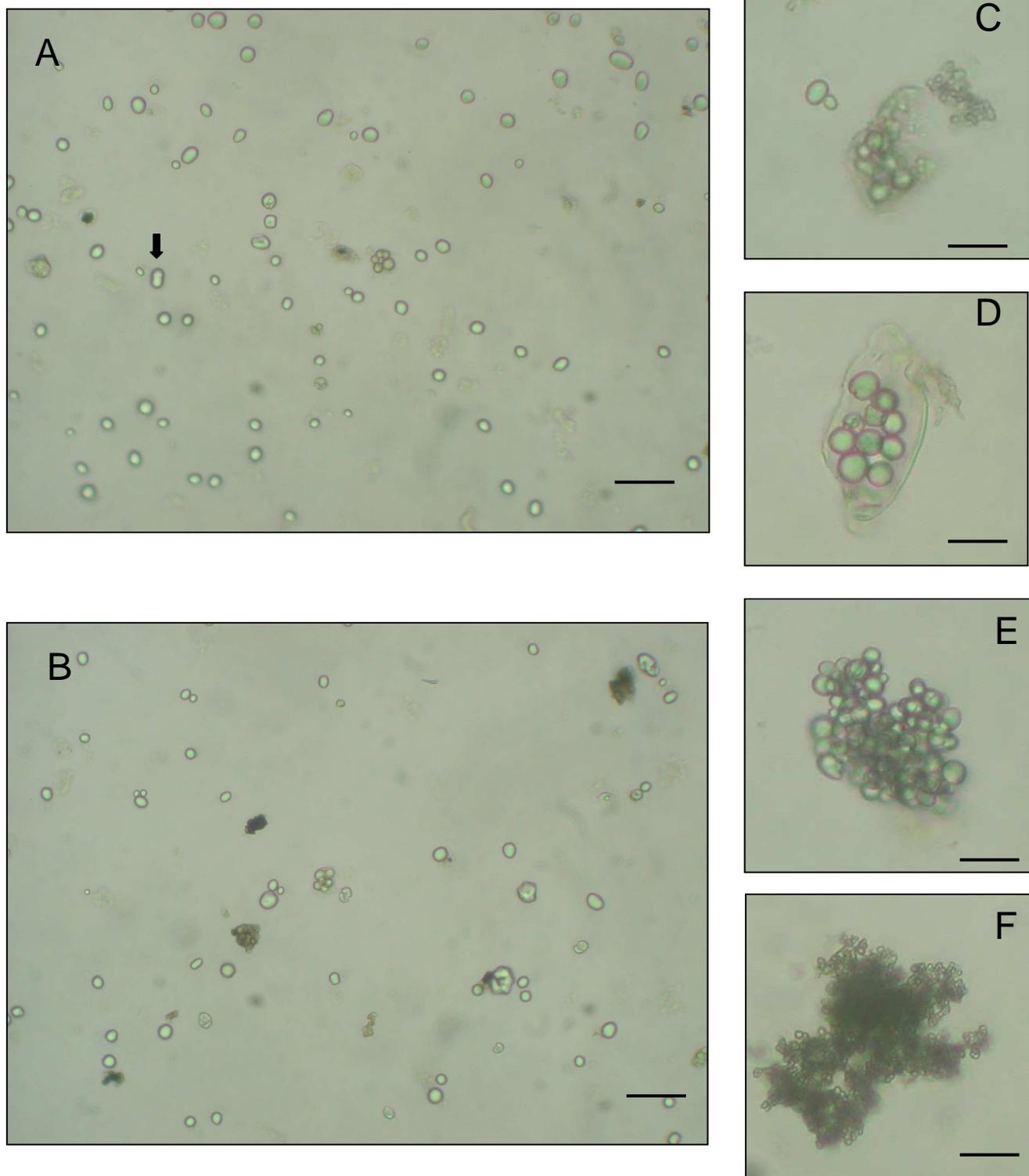


Fig. III.8. A-F. Cultivo celular tras dos semana en oscuridad (1 semana en medio con hormonas: $10^{-4}M$ de 2,4-D y BAP, y 1 semana en medio con precursores de ES: Caseína hidrolizada, Glutati3n oxidado y Glutati3n reducido en concentraci3n de 2 mM). La flecha indica c3lulas en divisi3n. C-E. Agregados celulares. F. Agregados celulares callosos. Barras = A: 208 μM ; B: 208 μM ; C: 67.5 μM ; D: 96 μM ; E: 86 μM ; F: 96 μM .

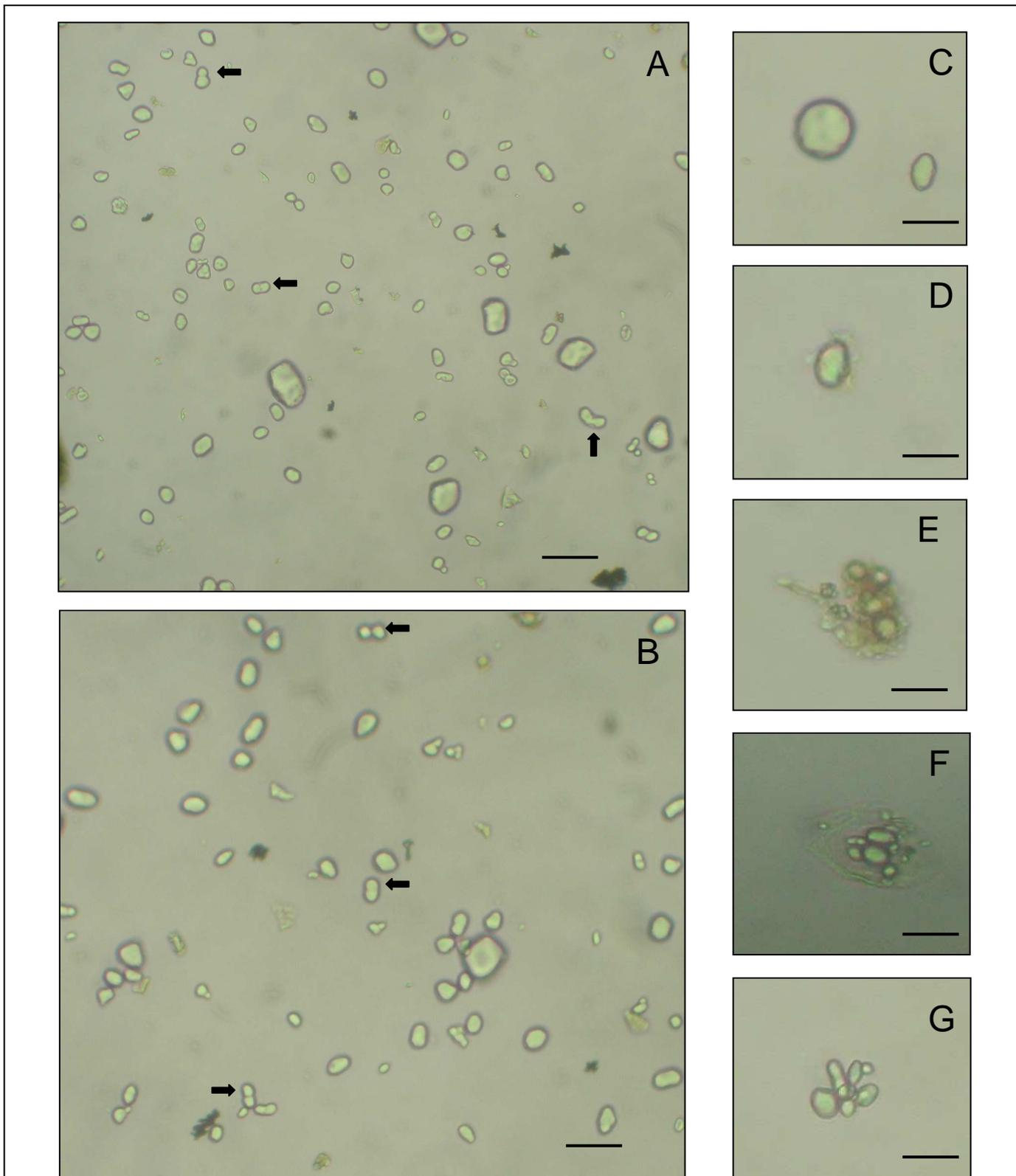


Fig. III.9. **A-G.** Cultivo celular tras tres semanas en oscuridad (1 semana en medio con hormonas: $10^{-4}M$ de 2,4-D y BAP, y 2 semana en medio con precursores de ES: Caseína hidrolizada, Glutación oxidado y Glutación reducido en concentraciones de 2mM). Las flechas indican células en división. **C-D.** Células globulares. **E-G.** Agregados celulares. Barras = A: 192 μM ; B: 192 μM ; C: 108 μM ; D: 65.7 μM ; E: 69.5 μM ; F: 90 μM ; G: 73.5 μM .

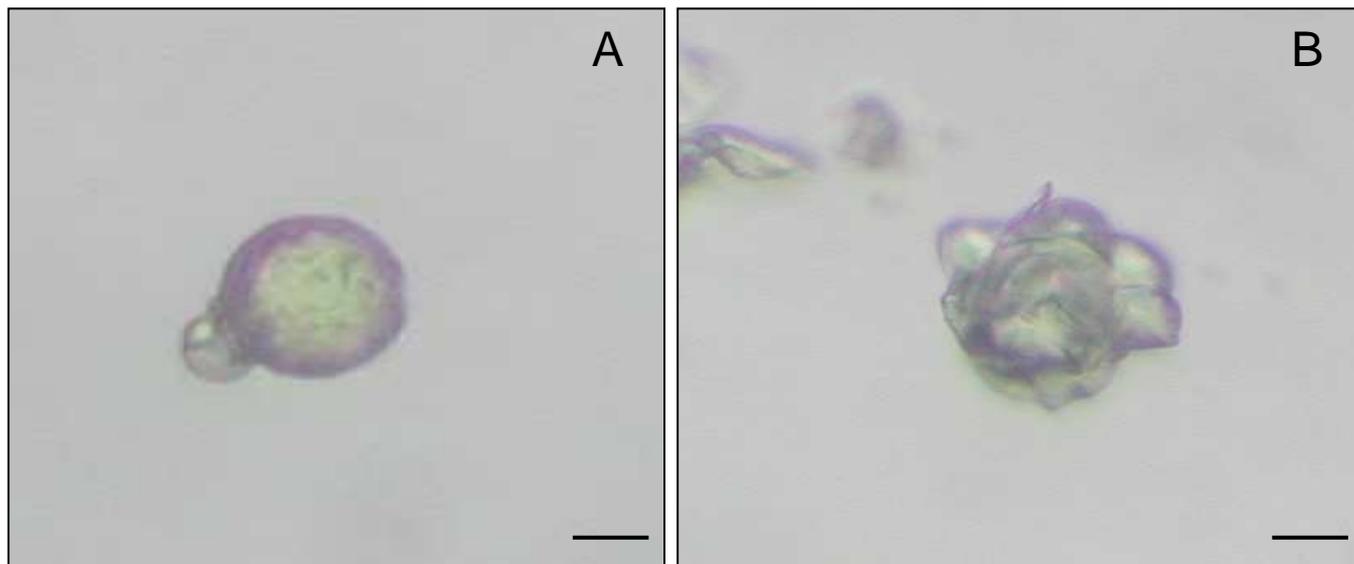


Fig. III.10. **A-B.** Células globulares pre-embionarias (<1%) tras siete semanas en cultivo (1 semana en medio con hormonas, 10^{-4} M de 2,4-D y BAP, y 6 semanas en medio con precursores de ES: Caseína, Glutación oxidado y Glutación reducido, 2mM). 5 semanas en oscuridad, 2 semanas en luz ($30 \mu\text{moles fotones m}^{-2} \text{s}^{-1}$). Barras = A: $35.7 \mu\text{M}$. B: $58.13 \mu\text{M}$.

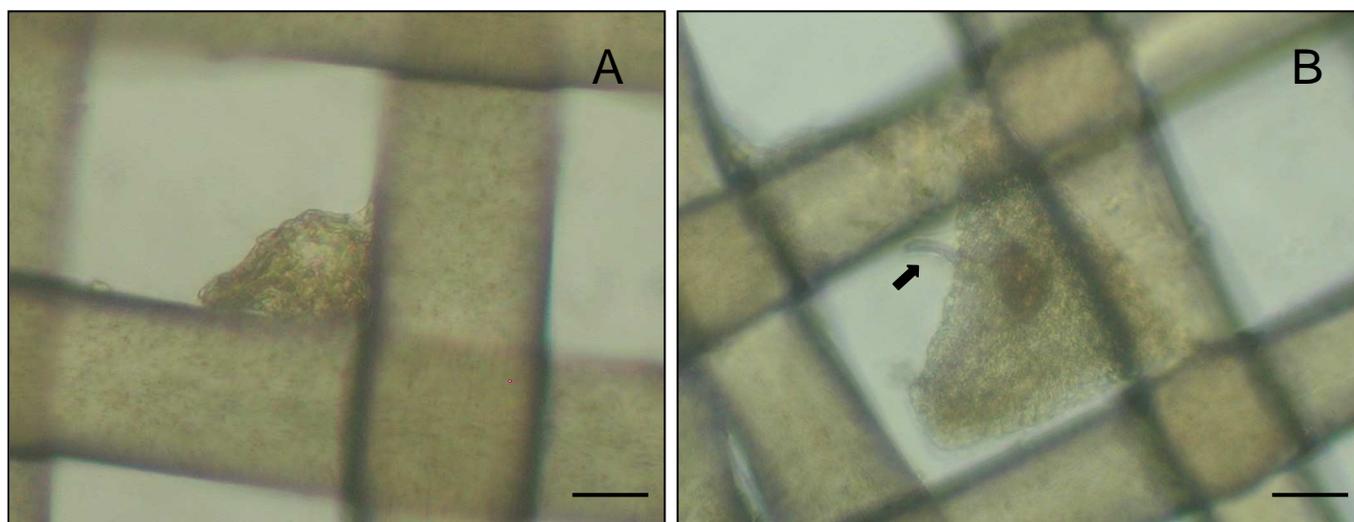


Fig. III.11. **A-B.** Cultivos celulares tras 10 semanas en cultivo (1 semana en medio con hormonas, 10^{-4} M de 2,4-D y BAP, y 9 semanas en medio con precursores de ES: Caseína hidrolizada, Glutación oxidado y Glutación reducido, 2mM). **A.** Célula globular pre-embionaria fijada a la malla. **B.** Estructura organizada tipo tejido. La flecha indica una estructura desarrollada de fijación. Barras = A: $113.6 \mu\text{M}$. B: $147 \mu\text{M}$.

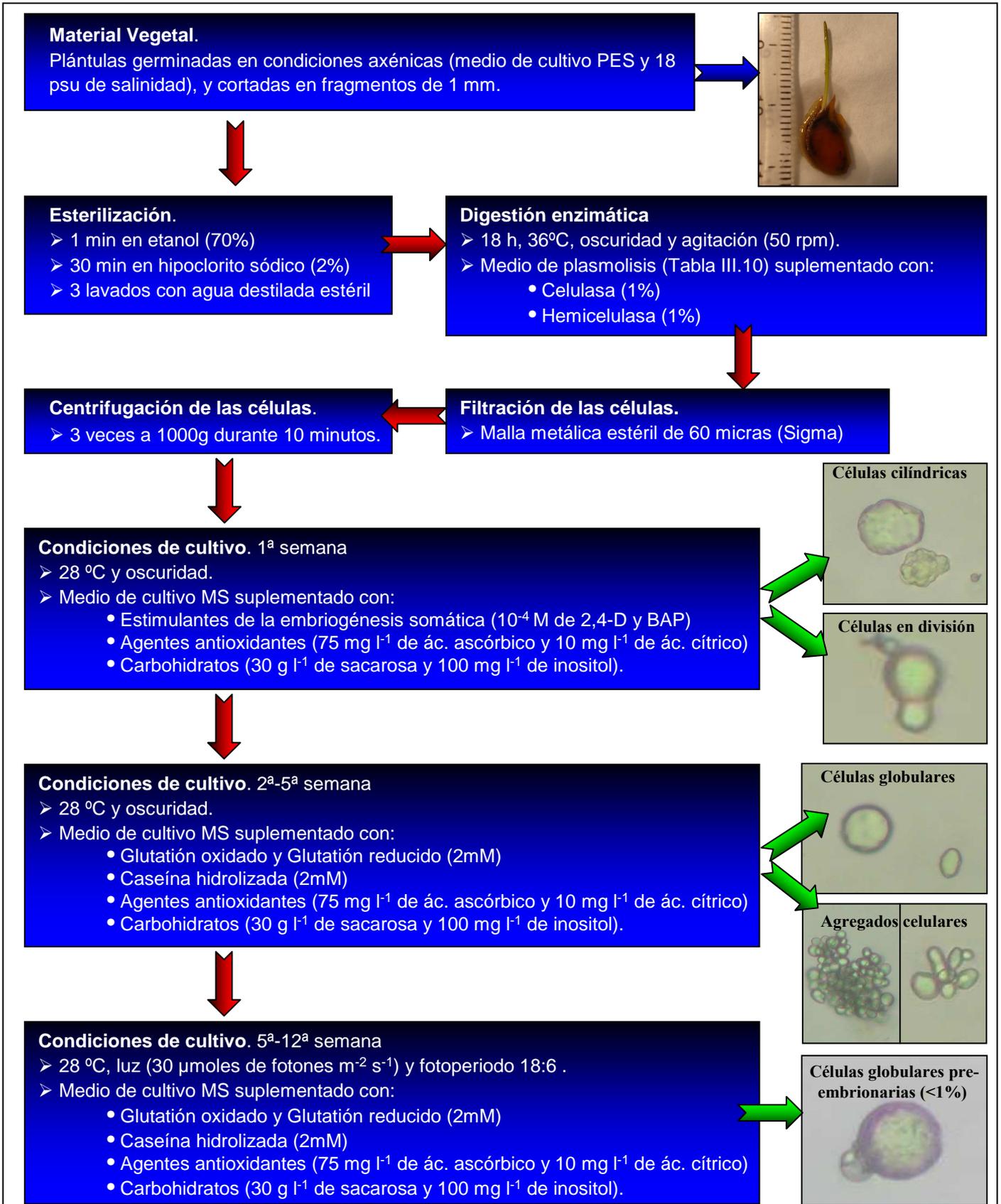


Fig. III.12. Esquema del procedimiento desarrollado para el establecimiento de cultivos celulares axénicos de *Cymodocea nodosa* a partir de tejido embrionario.