Interreg Sudoe

GT 7.1: Análisis del Comportamiento al Almacenamiento, Pretratamiento y Envasado

Informe. Actividad 7.1; Entregables 7.1.1 y 7.2.1

SOSPRADERAS

Yendo hacia atrás para alcanzar el futuro: Modernización del manejo tradicional de los prados de siega hacia la rentabilidad y la conservación de la naturaleza

PICOS DE EUROPA PARQUE NACIONAL · ipb INSTITUTO POLITÉCNICO DE BRAGANÇA · Universidad de Oviedo · iniav · GOBIERNO DE ARAGON · Semillas Silvestres

Yendo hacia atrás para alcanzar el futuro: Modernización del Manejo Tradicional de los prados de siega hacia la rentabilidad y la conservación de la naturaleza (SOS Praderas)

GT 7: Análisis del comportamiento al almacenamiento, pretratamiento y envasado; Informe teórico.

Coordinador:

Cándido Gálvez Ramírez

Autores:

Antonio Jesús Flores García (Semillas Silvestres)

Angela Medrán Viñas (Semillas Silvestres)

Cándido Gálvez Ramírez (Semillas Silvestres)

ÍNDICE DE CONTENIDOS

1. Introducción
2. Objetivos
3. Caracterización germinativa de semillas de prados de siega
   3.1 Origen de los lotes analizados
   3.2 Comportamiento germinativo
   3.3 Comportamiento al almacenamiento
   3.4 Presencia de dormancias
4. Pretratamiento
5. Almacenamiento
6. Envasado
7. Bibliografía Consultada

1. INTRODUCCIÓN

La conservación “ex situ” de semillas de plantas silvestres en bancos de germoplasma, ha sido un importante objetivo durante décadas para garantizar la disponibilidad de estos recursos fitogenéticos para las generaciones futuras.

Para lograr este objetivo, se han realizado importantes avances científicos, tanto en el desarrollo de métodos para la conservación, como en la caracterización de la germinación y los mecanismos biológicos implicados en ella. Fruto de estos trabajos, hoy se disponen de redes de bancos de germoplasma, organizadas tanto en el nivel nacional (e.g., REDBAG en España, RIBES en Italia) como en el internacional (e.g., GENMEDA, BANSEMAC, ENSCONET) y obras enciclopédicas donde consultar innumerable especies.

En este ámbito de trabajo, la comunidad científica española ha realizado importantes aportaciones en la conservación de la gran diversidad fitogenética ibérica. El Banco de Germoplasma Vegetal de la Escuela Técnica Superior de Ingenieros Agrónomos de Madrid que inició el Prof. César Gómez Campo, representó en su día el inicio de una gran línea de trabajo en todo el Mediterráneo para la correcta conservación de gran parte de la flora ibérica más amenazada.

Por otra parte, la conservación a corto plazo de las semillas agrícolas y otras de uso comercial, cuentan con protocolos de trabajo y conservación que garantizan su correcta utilización para los objetivos de uso a corto plazo necesarios para su distribución y uso comercial.

Sin embargo, el uso comercial de semillas de plantas silvestres, se encuentra en una situación intermedia, tanto en cuanto a los volúmenes de producción y comercialización, como en los métodos de trabajo, debido a la juventud del nuevo sector de la producción de las semillas nativas, como actividad comercial, y al cambio de escala y necesidad de adaptación a la misma, que esto implica.

A falta de unos protocolos de producción de estas especies, a caballo entre la agricultura y la conservación en bancos de germoplasma científico-técnicos, algunos organismos internacionales como la INSR (International Native Seed based Restoration) está elaborando unos estándares internacionales que permitan trabajar con la garantía técnica en un importante número de especies nativas ya comercializadas en diferentes áreas del globo. Mientras esta iniciativa no vea la luz en forma de un manual técnico, solo queda realizar trabajos de revisión bibliográfica de las especies de interés y avanzar sobre los problemas de manera parcial.

A efectos de garantizar la calidad de las semillas a distribuir como resultado aplicado de este proyecto en un futuro inmediato, se ha considerado necesario, por una parte, documentar el comportamiento al almacenamiento de las especies manejadas, y por otra, dar unas pautas básicas de envasado que permitan su distribución comercial con garantía técnica.

Para cumplir ambos objetivos, se ha intentado resumir en este informe los datos más relevantes que permitan la puesta en el mercado de las mezclas de semillas de los prados de siega, con garantía del mantenimiento de la viabilidad en un plazo razonable.

2. OBJETIVOS

El objetivo de este informe es incluir toda la información relativa al almacenamiento de las semillas recolectadas de los prados de siega para la obtención de mezclas representativas de los mismos, y los pre-tratamientos necesarios para garantizar las mayores tasas de germinación en campo, así como mostrar la propuesta de envasado y los materiales a usar en el mismo.

Este informe debe permitir abordar la producción de las semillas, en lo que respecta al envasado con las garantías necesarias para su comercialización final.

3. CARACTERIZACIÓN GERMINATIVA DE SEMILLAS DE LOS PRADOS DE SIEGA

En este apartado se muestra la información de las localidades origen de las semillas empleadas y los resultados de los análisis de germinación y caracterización de su almacenamiento, así como las recomendaciones para su manejo durante el proceso de producción comercial, en lo que respecta al almacenamiento y pretratamientos.

3.1. ORIGEN DE LOS LOTES

Los lotes de semillas empleados para el estudio germinativo y de almacenamiento, provienen de dos orígenes distintos que se describen sucintamente a continuación.

Una de las zonas de recolección es la Cordillera Cantábrica. Esta es una barrera montañosa que discurre paralela a la costa durante 480 km, con una línea de cumbre entre los 2.000 y 2.500 m. Se extiende desde el macizo Galaico-Leonés hasta la depresión vasca, pasando por los Picos de Europa.

La Cordillera se sitúa en las comunidades autónomas de Galicia, Asturias, Castilla y León, Cantabria, País Vasco, y desarrollándose en menor extensión en Navarra y La Rioja se une a la cordillera de los Pirineos al este.

La primera zona de recolección en la Cordillera Cantábrica, elegida por la calidad de sus prados de siega ha sido el Parque Natural de Picos de Europa. Este presenta un clima húmedo templado, de tipo Atlántico. En la vertiente norte es atlántico puro, y en la vertiente sur, atlántico-continental.

La segunda zona de recolección, elegida por su facilidad de acceso y extensión de los prados de siega, ha sido la Reserva de la Biosfera de los Valles de Omaña y Luna, que engloba las comarcas de Omaña y Luna, provincia de León, comunidad autónoma de Castilla y León, entre la que se encuentra el municipio de Muria de Paredes.

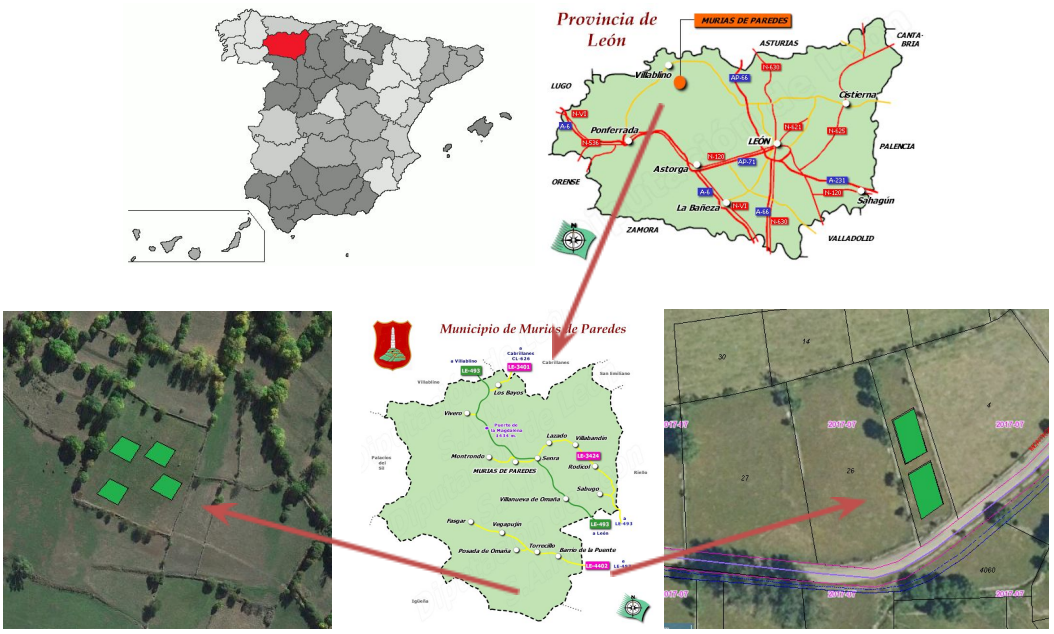
Su clima viene determinado en gran medida por el carácter montañoso, siendo clasificado como mediterráneo continentalizado, con inviernos fríos y frecuentes heladas, y veranos cálidos y secos.

Las semillas provenientes de la Cordillera Cantábrica han sido recolectadas por el Jardín Botánico Atlántico. Fueron enviadas a Semillas Silvestres, durante el 2016 para ser procesadas y limpiadas.

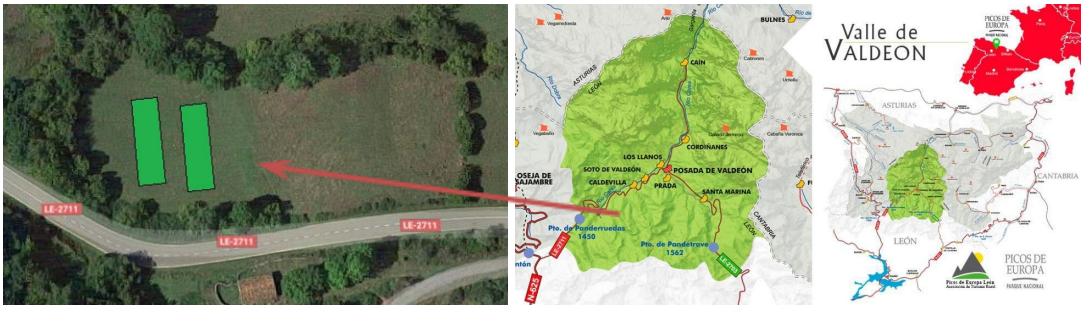
Las semillas provenientes de Omaña, fueron recolectadas por el propio equipo de Semillas Silvestres durante los años 2017 y 2018, durante los viajes realizados a Murias de Paredes para realizar los ensayos de mecanización de la recolección de semillas.

3.2 MAPAS DE LAS ZONAS DE TRABAJO

A) La localidad de Murias de Paredes, dentro de la Reserva de la Biosfera de los valles de Omaña y Luna, en León.



B) Caldevilla de Valdeón, dentro del Parque Nacional de Picos de Europa (PNPE), provincia de León.



3.2 COMPORTAMIENTO GERMINATIVO

A efectos de evaluar la capacidad germinativa de las semillas recolectadas, se han realizado test de germinación en condiciones de laboratorio y en invernadero.

Las condiciones de los ensayos de germinación en estufa de germinación en laboratorio fueron las siguientes:

- **Temperatura:** 10º C noche y 20º C día
- **Fotoperiodo:** 12 horas de luz y 12 de oscuridad
- **Intensidad de luz:** 33 %
- **Sustrato:** doble papel de filtro
- **Recipientes:** placas Petri 9,5 cm diámetro selladas con parafilm
- **Número de semillas:** 50 semillas por placa, en total 400 semillas por lote

Para la evaluación de la germinación bajo condiciones de invernadero se emplearon las siguientes condiciones:

- **Bandejas:** de poliespan con 25 cc por alveolo
- **Número de semillas:** una por alveolo
- **Sustrato:** mezcla comercial de sustrato para jardinería de interior
- **Luz:** natural
- **Riego:** 2 riegos de 5 minutos al día
- **Fecha de siembra:** 16 a 19 de enero de 2017

Las plántulas germinadas eran retiradas en ambos tipos de ensayos a medida que se realizaban los conteos diarios durante cuatro semanas.

En las siguientes tablas se indican los resultados de las germinaciones realizadas con las semillas recolectadas e indicadas en el apartado anterior.

			Germinación (%)	
Especie	Código	Nº Especie	Invernadero	Estufa
Anthoxanthum odoratum	020816-05	20	74,7	93
Arrhenatherum elatius	210716-09	7	99,0	94
Arrhenatherum elatius	210716-09		99,0	92
Arrhenatherum elatius	210716-02		95,8	86
Briza media	210716-07	13	70,7	100
Bromus hordeaceus	210716-01	15	56,4	100
Centaurea scabiosa	020816-06	21	29,3	30
Cynosurus cristatus	210716-06	5	69,4	97
Cynosurus cristatus	020816-02		76,4	90
Dactylis glomerata	210716-5	12	10,7	62
Dactylis glomerata	210716-5		17,8	74
Holcus lanatus	020816-01	19	52,4	100
Holcus lanatus	020816-01		77,8	100
Knautia arvernensis	210716-12	6	20,5	66
Leucanthemum vulgare	210716-13	2	29,5	9
Linum bienne	210716-02	11	48,4	96
Malva moschata	210716-15	3	2,8	3
Medicago lupulina	210716-01	4	4,2	5
Plantago lanceolata	210716-08	14	28,4	88
Ranunculus acris	210716-06	18	2,2	88
Ranunculus acris	020816-03		6,2	97
Rhinanthus angustifolius	210716-09	1	0,0	0
Rhinanthus angustifolius	210716-09		0,0	0
Rhinanthus angustifolius	210716-09		0,0	0
Sanguisorba minor	210716-04	16	5,8	60
Silene vulgaris	210716-11	8	78,4	95
Trisetum flavescens	210716-03	17	71,3	91
Trifolium campestre	210716-04	9	7,4	13
Trifolium pratense	020816-04	10	32,4	25

Tabla nº 1: Resultados de la germinación de los lotes de semillas de 21 especies de prados de siega ibéricos en estufa de germinación e invernadero. Año 2017.

Se adjunta tabla que explica la procedencia de los porcentajes de germinación obtenidos para la germinación en Invernadero.

Especie	Número Alveolos	Número Plántulas	Germ. (%)
Anthoxantum odoratum	225	168	74,7
Arrhenatherum elatius subsp. Bulbosum	288	285	99,0
Arrhenatherum elatius subsp. Bulbosum	288	285	99,0
Arrhenatherum elatius subsp. Bulbosum	288	276	95,8
Briza media	225	159	70,7
Bromus hordeaceus	225	127	56,4
Centaurea scabiosa	225	66	29,3
Cynosurus cristatus	288	200	69,4
Cynosurus cristatus	288	200	76,4
Dactylis glomerata	225	24	10,7
Dactylis glomerata	225	40	17,8
Holcus lanatus	225	118	52,4
Holcus lanatus	225	175	77,8
Knautia arvenensis	288	59	20,5
Leucanthemum vulgare	288	85	29,5
Linum bienne	225	109	48,4
Malva moschata	108	3	2,8
Medicago lupulina	288	12	4,2
Plantago lanceolata	225	64	28,4
Ranunculus acris subsp. Despectus	225	5	2,2
Ranunculus acris subsp. Despectus	225	14	6,2
Rhinanthus angustifolius	288	0	0,00
Rhinanthus angustifolius	288	0	0,00
Rhinanthus angustifolius	288	0	0,00
Sanguisorba minor	225	13	5,8
Silene vulgaris	162	127	78,4
Trisetum flavescens	150	107	71,3
Trifolium campestre	162	12	7,4
Trifolium pratense	225	73	32,4

Tabla nº 2: Resultados de la germinación bajo condiciones de invernadero de 21 especies de los prados de siega ibéricos. Recolección en la Reserva de la Biosfera de Omaña y Valle de Luna.

En el año 2018, se realiza un segundo análisis de germinación con especies de los dos orígenes descritos. Se utilizan semillas de la Cordillera Cantábrica para estudiar si se mantiene el poder germinativo de las semillas tras un año de conservación en cámara frigorífica, y se añaden nuevas especies de la zona de Omaña, indicando el origen de

cada especie o su código (para la trazabilidad) y el porcentaje de germinación obtenido.

En esta ocasión, se utilizaron 150 alveolos por especie, y una semilla por alveolo.

La siembra se realizó a mediados de noviembre del 2018.

Especie	Código	Familia	Número Alveolos	Número Plantulas	Germinación (%)
Anthoxanthum odoratum	020816-05	Poacea	150	132	88,0
Achilea millefolium	ACHIMI1701	Asteracea	150	25	16,7
Arrhenatherum elatius	210716-09	Poacea	150	135	90,0
Bromus hordeaceus	210716-01	Poacea	150	145	96,7
Centaurea scabiosa	020816-06	Asteracea	150	44	29,3
Centaurea scabiosa	CENSC1701	Asteracea	150	105	70,0
Chelidonium majus	CHEMA1701	Papaveracea	150	11	7,3
Cynosurus cristatus	020816-02	Poacea	150	130	86,7
Dactylis glomerata	210716-5	Poacea	97	97	64,7
Echium vulgare	ECHIVU1701	Boraginacea	25	25	16,7
Fragaria vesca	FRAVE1701	Rosacea	150	149	99,3
Holcus lanatus	020816-01	Poacea	150	140	93,3
Knautia arvernensis	210716-12	Caprifoliacea	150	7	4,7
Leucanthemum vulgare	210716-13	Asteracea	150	80	53,3
Linum bienne	210716-02	Linacea	148	148	98,7
Medicago lupulina	210716-01	Fabacea	150	27	18,0
Plantago lanceolata	210716-08	Plantaginacea	145	145	96,7
Ranunculus acris	020816-03	Ranunculacea	150	123	82,0
Sanguisorba minor	210716-04	Rosacea	150	31	20,7
Viola arvensis	VIAR1701	Violacea	150	148	98,7

Tabla nº 3: Resultados de los análisis de germinación en invernadero de 19 especies de los prados de siega ibéricos. Año 2018.

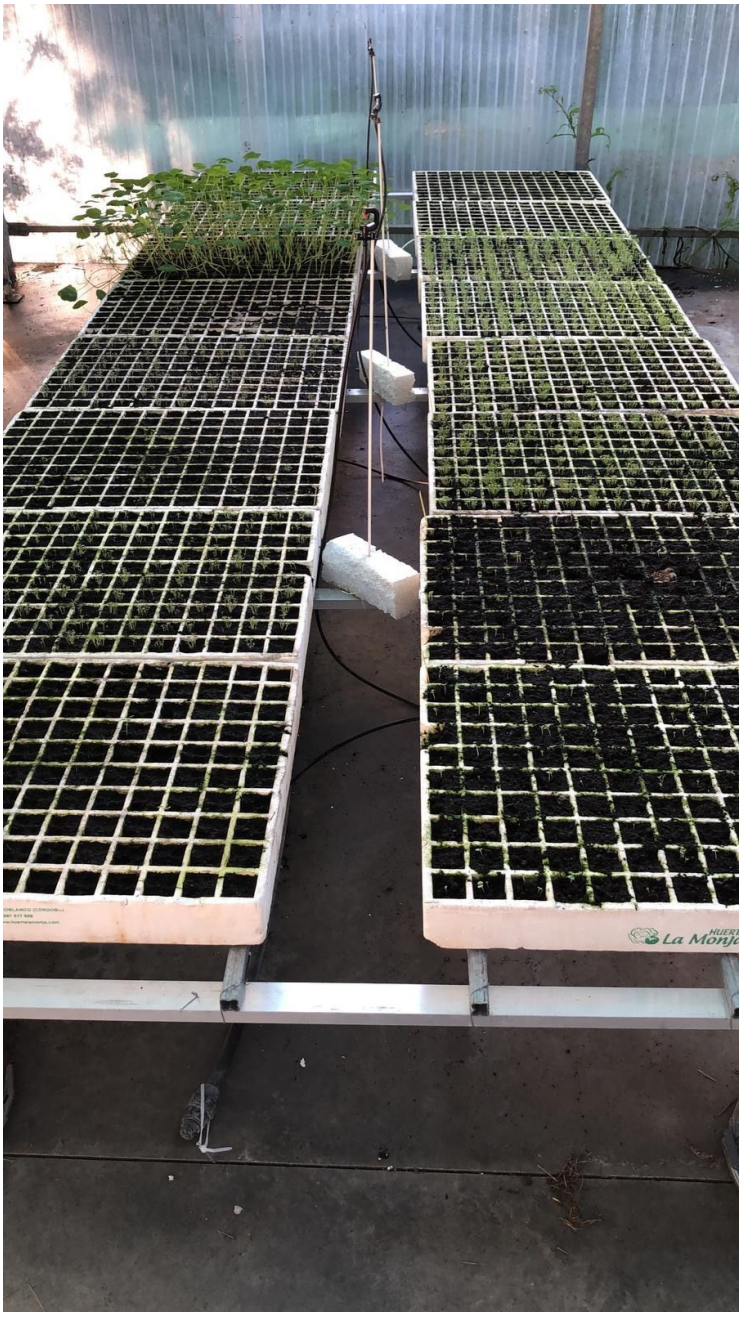


Figura nº 1: Ensayo de germinación bajo condiciones de invernadero.

3.3 COMPORTAMIENTO DE LAS SEMILLAS AL ALMACENAMIENTO

El comportamiento de las semillas al almacenamiento es clave para determinar las mejores condiciones en las que conservarlas hasta el momento de su uso.

Mientras que la mayoría de las semillas de especies mediterráneas mantienen mejor su viabilidad cuando se conservan con bajos contenidos de humedad y a bajas temperaturas, otras no sobreviven cuando desciende su contenido en humedad de un determinado valor. Roberts (1973) define dos categorías de semillas respecto a su comportamiento al almacenamiento: ortodoxas y recalcitrantes.

Las semillas de especies con comportamiento al almacenamiento ortodoxo presentan tolerancia a la deshidratación durante su desarrollo y pueden almacenarse en seco, lo que les permite mantenerse satisfactoriamente "ex situ" durante periodos largos bajo condiciones adecuadas. Conservan un alto vigor y viabilidad durante varias décadas si se conservan a una temperatura de -18º C (IPGR, 1976). Además, prácticamente todas las semillas de este grupo resisten hasta un contenido de humedad menor del 5%.

El mantenimiento de la viabilidad de las semillas con comportamiento al almacenamiento recalcitrante es más problemático. Estas son semillas que germinan inmediatamente después de ser dispersadas. Son semillas que para su conservación deben pasar por un corto proceso de secado, llegando incluso a saltarse este paso, cuando para las ortodoxas es un proceso de mayor duración que debe realizarse siempre. Las semillas de tipo recalcitrante pierden viabilidad conforme empiezan a secarse, descendiendo de manera ligera primero, hasta que llega a un determinado contenido en humedad en la semilla, conocido como "contenido crítico de humedad", a partir del cual baja drásticamente. Presentan un rango de adaptabilidad a la desecación muy variado, y se puede generalizar puntuando que con un porcentaje de HR entre un 12 y 30%, pueden llegar a perder totalmente su viabilidad.

Para determinar las condiciones óptimas de almacenamiento y envasado de las especies contempladas en este proyecto, se ha realizado un estudio bibliográfico de 30 de ellas incluidas en las listas de taxones representativos de las cinco zonas de interés.

Los resultados de esta revisión, se presentan en la siguiente tabla.

Especie	Familia	Comportamiento	Condiciones
Achillea millefolium	Asteraceae	Ortodoxa	IPGR Standards
Agrostis capillaris	Poaceae	Ortodoxa	IPGR Standards
Anthoxanthum odoratum	Poaceae	Ortodoxa	IPGR Standards
Arrhenatherum elatius sl.	Poaceae	Ortodoxa	IPGR Standards
Briza media	Poaceae	Ortodoxa	IPGR Standards
Bromus hordeaceus	Poacea	Ortodoxa	15% HR, freezing 3 meses a (-)20º C
Centaurea scabiosa	Asteraceae	Ortodoxa	IPGR Standards
Cerastium fontanum	Caryofilaceae	Ortodoxa	IPGR Standards
Cynosurus cristatus	Poaceae	Ortodoxa	IPGR Standards
Dactylis glomerata	Poaceae	Ortodoxa	IPGR Standards
Holcus lanatus	Poaceae	Ortodoxa	IPGR Standards
Knautia arvenensis	Caprifoliaceae	Ortodoxa	15% HR, freezing 50 días a (-) 20º C
Leucanthemum vulgare	Asteraceae	Ortodoxa	IPGR Standards
Linum bienne	Linaceae	Ortodoxa	IPGR Standards
Lotus corniculatus	Fabaceae	Ortodoxa	IPGR Standards
Malva moschata	Malvaceae	Ortodoxa	IPGR Standards
Medicago lupulina	Fabaceae	Ortodoxa	IPGR Standards
Pimpinella major	Apiaceae	Ortodoxa	IPGR Standards
Plantago lanceolata	Plantaginaceae	Ortodoxa	IPGR Standards
Plantago major	Plantaginaceae	Ortodoxa	IPGR Standards
Poa pratensis	Poaceae	Ortodoxa	IPGR Standards
Prunella vulgaris	Lamiaceae	Ortodoxa	IPGR Standards
Ranunculus acris	Ranunculaceae	Ortodoxa	IPGR Standards
Rumex acetosa	Polygonaceae	Ortodoxa	IPGR Standards
Sanguisorba officinalis	Rosaceae	Ortodoxa	IPGR Standards
Silene vulgaris	Cariofilaceae	Ortodoxa	15% HR, freezing 286 días a (-) 20º C
Taraxacum officinale	Asteraceae	Ortodoxa	15% HR, freezing 2 meses a (-)20º C
Tragopogon pratensis	Asteraceae	Ortodoxa	IPGR Standards
Trifolium pratense	Fabaceae	Ortodoxa	IPGR Standards
Trisetum flavescens	Poaceae	Ortodoxa	IPGR Standards

Tabla nº 4: Comportamiento de las semillas de especies propias de los prados de siega ibéricos frente al almacenamiento y recomendaciones para su almacenamiento.

Todas las especies consideradas muestran un comportamiento al almacenamiento de tipo Ortodoxo. Esto nos permite focalizar la metodología a seguir de manera sencilla,

puesto que todas se rigen por el mismo protocolo. No obstante hay alguna especie más especial que requiere de algún paso previo extra al estándar.

Las condiciones estándar propuestas por el International Plant Genetic Resources (IPGR) para las semillas de comportamiento ortodoxo son:

1) Desecar las semillas a 15º C, al 10-15% de Humedad, hasta conseguir que la semilla presente una HR del 4 al 7%.
2) Utilizar un recipiente hermético.
3) Almacenar a -18º C.

Esto asegura una supervivencia y alta viabilidad del lote durante una década.

Si lo que se pretende es una conservación durante un periodo menor de tiempo, se pueden seguir las siguientes indicaciones:

1) Desecar las semillas hasta que presenten un HR del 7 al 8%.
2) Utilizar un recipiente hermético.
3) Almacenar entre 0 y 10º C.

Los apartados siguientes en este estudio sobre la conservación de las semillas, se centran en proponer parámetros adaptados a las especies de comportamiento al almacenamiento de tipo ortodoxo.

Cuando se hace referencia al almacenamiento, se describe el periodo que abarca desde que empieza a madurar la semilla en la planta, previo a su dispersión, hasta que es sembrada. Durante ese periodo, la longevidad del lote puede descender a ritmos vertiginosos

Las especies seleccionadas permiten el almacenamiento de su semilla, por lo que el único proceso que podría diferenciar el tratamiento de éstas, es si se trata de semillas con letargo y requieren de un pretratamiento. Este apartado será descrito en el apartado 4 de este documento.

Por tanto, los factores a tener en cuenta en este apartado, serán la temperatura y la humedad, siendo éstos los que más harán variar la viabilidad del lote, y los que podremos modificar para prolongar la longevidad de las semillas. Ya postuló Harrington (1972) dos reglas en las que relaciona dichos factores con la velocidad del deterioro de las semillas:

1) Por cada 1% de reducción en la humedad, las semillas doblan su vida.
2) Por cada 5º C de reducción en la temperatura, la semilla dobla su vida.

Figura nº 2: Vista de la mezcla de las distintas especies analizadas.

Existe un rango máximo de reducción de estos parámetros, al menos, queda reflejado muy claramente para la HR. Las semillas deben secarse cuanto antes tras su recolección, preferiblemente por debajo del 10-13% de HR, ya que de lo contrario, se favorece un "calentamiento" debido a los microorganismos en presencia de oxígeno, que provocarían una muerte rápida, o del crecimiento de hongos que acabarán destruyendo a los embriones. No obstante, ésta tampoco debería ser inferior al 4%, dado que puede producir un deterioro mayor porque se da el proceso de "autoxidación lipídica" (Koostra y Harrington, 1969).

La temperatura, muy ligada a la humedad relativa, no debería provocar la formación de cristales de hielo si la humedad relativa se encuentra por debajo del 14%. El problema con el almacenamiento por tiempo prolongado a temperaturas excesivamente bajas, es que provoca que las semillas acaben ganando humedad, y por tanto, formando los destructivos cristales de hielo, incluso aun cuando no se formaran durante su almacenamiento. Es por esto que lo recomendable sería establecer una temperatura mínima de 0-5º C.

A la vista del comportamiento ortodoxo y las recomendaciones de almacenamiento, se establecen dos métodos para el almacenamiento de las semillas dependiendo de su uso.

Por una parte, la **conservación de semillas de lotes comerciales puede hacerse sin pérdidas significativas de viabilidad a corto plazo a temperatura ambiente y humedad relativa no superior a 30%**, lo que es fácil de conseguir sin infraestructuras específicas para conservación de semillas.

En segundo lugar, se propone la conservación de **lotes de semillas para multiplicación, a mantener durante varios años hasta el momento de su siembra en campos de multiplicación, a temperaturas comprendidas entre 0 y 5º C, después de lograr bajar el contenido de humedad en las semillas por debajo del 7%**.

3.4 PRESENCIA DE DORMANCIAS

De acuerdo a la clasificación propuesta por **Baskin & Baskin (1998)** existen 5 tipos de dormición:

- **A) Fisiológica**: Desarrollo reducido del embrión, que no consigue rebasar el impedimento mecánico de las cubiertas de la semilla (o del fruto).
- **B) Morfológica**: Embrión pequeño diferenciado (pero poco desarrollado) o no diferenciado. En este caso el periodo de dormición corresponde al tiempo que el embrión necesita para crecer.
- **C) Morfofisiológica**: Combinación de un embrión no desarrollado (o indiferenciado) y fisiológicamente durmiente.
- **D) Física**: la cubierta de la semilla (o fruto) posee una capa impermeable que no permite la absorción de agua.
- **E) Combinatoria (Física + Fisiológica):** Semilla impermeable con embrión fisiológicamente durmiente.

De las 21 especies consideradas en los ensayos de germinación, siete de ellas presentan porcentajes de germinación inferiores al 50%, a pesar de presentar viabilidad al corte cercanas al 100%, lo que implica la presencia de letargo o dormancia.

De ellas, tres son leguminosas (*Medicago lupulina, Trifolium campestre* y *T. pratensis*), con presencia de una cubierta seminal impermeable, dos son compuestas (*Centaurea scabiosa* y *Leucanthemum vulgare*) con frecuente dormancia mecánica, y una malvácea (*Malva moschata*) igualmente por la dureza de la testa de sus mericarpos. Es decir, todas ellas presentan letargo mecánico.

Por otra parte, *Rhinanthus angustifolius*, muestra una falta total de germinación en todos los ensayos, tanto en invernadero como bajo condiciones de incubación en laboratorio. En esta especie, la bibliografía consultada describe la presencia de dormancia morfofisiológica (Marin M., 2017)

		Porcentajes		
Especie	**Familia**	**Invernadero**	**Estufa**	**Dormancia**
Anthoxanthum odoratum	Poaceae	74,7	93	No Presenta
Arrhenatherum elatius	Poaceae	99,0	92	No Presenta
Briza media	Poaceae	70,7	100	No Presenta
Bromus hordeaceus	Poaceae	56,4	100	No Presenta
Centaurea scabiosa	Asteraceae	29,3	30	Mecánica
Cynosurus cristatus	Poaceae	76,4	90	No Presenta
Dactylis glomerata	Poaceae	10,7	62	No Presenta
Holcus lanatus	Poaceae	52,4	100	No Presenta
Knautia arvernensis	Caprifoliaceae	20,5	66	Mecánica
Leucanthemum vulgare	Asteraceae	29,5	9	Mecánica
Linum bienne	Linaceae	48,4	96	No Presenta
Malva moschata	Malvaceae	2,8	3	Mecánica
Medicago lupulina	Fabaceae	4,2	5	Mecánica
Plantago lanceolata	Plantaginaceae	28,4	88	No Presenta
Ranunculus acris	Ranunculaceae	2,2	88	No Presenta
Rhinanthus angustifolius	Orobanchaceae	0,0	0	Fisiológica
Sanguisorba minor	Rosaceae	5,8	60	No Presenta
Silene vulgaris	Caryophillaceae	78,4	95	No Presenta
Trifolium campestre	Fabaceae	7,4	13	Mecánica
Trifolium pratense	Fabaceae	32,4	25	Mecánica
Trisetum flavescens	Poaceae	71,3	91	No Presenta

Tabla nº 5: Germinación bajo condiciones de invernadero y laboratorio, y presencia de dormancia de 21 especies de los prados de siega ibéricos.

4. PRETRATAMIENTO

Para las semillas de los prados de siega manejadas en este proyecto, se aconsejan los siguientes pre-tratamientos, a la vista de la presencia de letargos, tanto por la revisión bibliográfica como por los resultados en los análisis de germinación en invernadero y laboratorio.

A) *Rhinanthus angustifolius*: se propone realizar una estratificación fría previa, durante tres meses.

La estratificación fría, o vernalización, es la exposición de las semillas durmientes a temperaturas variables de entre +2ºC y +5ºC (Come, 1970) en condiciones húmedas y aireadas (desnudas o mezcladas con un sustrato blando como serrín) durante periodos que dependen de cada especie o lote. La vernalización simula la acción que el invierno efectúa sobre algunas semillas.

B) *Centaurea scabiosa, Knautia arvernensis, Leucanthemum vulgare, Malva moschata, Medicago lupulina, Trifolium campestre, Trifolium pratense*: Dado que presentan una dormición física (o mecánica), se propone su procesado previo a la comercialización, consistente en escarificar el tegumento de manera mecánica.

La escarificación mecánica incluye el agujereado, el corte o la abrasión con arena o lija de los tegumentos externos con el fin de permitir la imbibición de las semillas. La porción de la semilla más apta para la escarificación mecánica es aquella situada inmediatamente sobre el ápice de los cotiledones.

La escarificadora, que consiste en una criba tubular por la que pasan las semillas y un cepillo, que al rotar, provoca que el tegumento de las semillas sea arañado. Este proceso debe ser ajustado en tiempo según la dureza y el grosor de la testa de cada especie. Como regla general, se recomienda mantener las semillas en el tambor durante dos minutos.

En caso necesario, se puede repetir la operación las veces necesarias hasta obtener incremento de la germinación.

Figura nº 3: Fotografía de una escarificadora.

C) El resto de las semillas, mostraron porcentajes de germinación suficientes, por lo que no se aconseja pretratamiento alguno.

Especie	Familia	Dormancia	Pre-tratamiento
Anthoxanthum odoratum	Poaceae	No Presenta	-
Arrhenatherum elatius	Poaceae	No Presenta	-
Briza media	Poaceae	No Presenta	-
Bromus hordeaceus	Poaceae	No Presenta	-
Centaurea scabiosa	Asteraceae	Mecánica	Escarificación
Cynosurus cristatus	Poaceae	No Presenta	-
Dactylis glomerata	Poaceae	No Presenta	-
Holcus lanatus	Poaceae	No Presenta	-
Knautia arvernensis	Caprifoliaceae	Mecánica	Escarificación
Leucanthemum vulgare	Asteraceae	Mecánica	Escarificación
Linum bienne	Linaceae	No Presenta	-
Malva moschata	Malvaceae	Mecánica	Escarificación
Medicago lupulina	Fabaceae	Mecánica	Escarificación
Plantago lanceolata	Plantaginaceae	No Presenta	-
Ranunculus acris	Ranunculaceae	No Presenta	-
Rhinanthus angustifolius	Orobanchaceae	Fisiológica	Estratificación Fría
Sanguisorba minor	Rosaceae	No Presenta	-
Silene vulgaris	Caryophillaceae	No Presenta	-
Trifolium campestre	Fabaceae	Mecánica	Escarificación
Trifolium pratense	Fabaceae	Mecánica	Escarificación
Trisetum flavescens	Poaceae	No Presenta	Escarificación

Tabla nº 6: Pretratamientos para las semillas de 21 especies de los prados de siega ibéricos.

5. CONSERVACIÓN Y ALMACENAMIENTO

Dado el carácter ortodoxo del comportamiento al almacenamiento de todas las semillas de los prados de siega considerados en este trabajo, los principios técnicos para su conservación a corto plazo, único objetivo planteado en este capítulo del proyecto, son mantener las semillas a baja humedad relativa y temperatura.

A continuación se indican los principios para el almacenamiento de las semillas en bancos de germoplasma, a efectos de mostrar la importancia de cada uno de estos aspectos en la conservación de las semillas ortodoxas de los prados de siega.

A. Principios técnicos para el almacenamiento de semillas ortodoxas en banco de germoplasma "ex situ"

Con el fin de garantizar una buena conservación a largo plazo de semillas ortodoxas, lo más importante es verificar el bajo contenido de humedad en la semilla, por ser éste, con gran diferencia, el parámetro más esencial entre los que pudieran influir en el éxito del proceso. Es necesario tener en cuenta que las semillas se secan de forma natural para frenar su metabolismo y durar más tiempo, por lo que los procesos a los que se las somete deben parecerse lo más posible al secado natural.

Con respecto al envasado, éste debe tener una hermeticidad probada, en el sentido de no permitir el paso de vapor de agua a su interior. Si el envase no es hermético, la humedad de la semilla tenderá a equilibrarse con la humedad ambiental exterior, por lo que las ventajas de las bajas temperaturas apenas se notarían en semillas húmedas. Debe tenerse en cuenta que la humedad relativa en una cámara fría suele ser muy alta, que las semillas secas son fuertemente higroscópicas, y que por lento que fuera el paso de humedad al interior del envase, se cuenta con muchos años por delante para que ello termine ocurriendo.

También es necesario estudiar el uso práctico de cada envase, esto es, ver cuál es su finalidad. Puesto que no van a tener el mismo uso una muestra que vaya para conservación a un banco de germoplasma, que una muestra creada con fines comerciales, diseñada para ser vendida y usada en un periodo corto de tiempo.

Ya en el año 2002, Gómez-Campo hizo una prueba de hermeticidad a unos cuarenta tipos distintos de envase, de los cuales, sólo se mostraron herméticos cuatro envases.

Los tubos de vidrio cerrados a la llama. En tan solo el 0,2% de ellos aparecían casos de entrada de humedad, por rotura de la punta soldada. Es el envase ideal para muestras pequeñas y de semillas no demasiado grandes.

Los tarros de appertización, con junta de goma y tapa apalancada. Estas permiten almacenar un mayor tamaño. Requieren de cierta revisión periódica, ya que la junta de goma puede tener que ser repuesta con el paso del tiempo.

Los frascos de vidrio con tapa de plástico. Bastante herméticos, pero con el inconveniente de tener una boca estrecha para meter las semillas, además de que las piezas de plástico no se recomiendan para su uso a largo plazo.

Latas metálicas termosoldadas y plastificadas en su interior. Aunque permiten una conservación a muy largo plazo, al ser opaco, presenta una desventaja, ya que impide un control visual del estado de la muestra.

No obstante, a pesar de ser los que presentan una mayor eficacia para la conservación a largo plazo, no son los únicos envasados utilizados hoy en día.

En bancos de germoplasma, las foil bags, o sobres termosellados de aluminio plastificado, tienen un uso masivo, al menos los tri-laminados, aunque pueden llegar a sufrir un 20% de pérdida o humedecimiento a la larga.

B) Método alternativo para la conservación de semilla de prados de siega a escala comercial.

La secuencia de trabajo para una correcta y eficaz conservación de lotes de semillas comerciales comprendidas entre cientos de gramos y miles de Kg es la siguiente:

I) Comprobar la Humedad Relativa (HR) del lote de semillas con Higrotester.

Figura nº 4: Equipo Higrotester para medir el contenido de humedad de las semillas durante el almacenamiento.

II) Almacenamiento de las semillas en cámara de secado con humedad relativa menor del 30%.

III) Mantenimiento de la semilla durante 15 días hasta conseguir el equilibrio con el ambiente.

IV) Comprobar la HR de las semillas. Si está comprendida entre 3 y 7%, proceder a su envasado. Si es superior a 7% de HR, mantener en la cámara desecante una semana más y volver a comprobar.

V) Una vez alcanzado el contenido de HR deseado, proceder a su envasado en bolsas de polietileno con indicador de humedad. Sellado de las bolsas.

VI) Las bolsas selladas se conservan en cámara bajo condiciones controladas de HR (<30%) y Temperatura (5-15º C) hasta el momento de su comercialización.

Figura nº 5: Conservación en sacos de semillas nativas para su distribución comercial.

Figura nº 6: Conservación de semillas en banco de germoplasma en tubos de cristal y plástico.

6. ENVASADO

La elección del envase adecuado es fundamental para la conservación de las semillas a medio y largo plazo. De hecho, los materiales de envasado y las técnicas de sellado para la conservación de las semillas en los bancos de germoplasma han evolucionado sensiblemente en los últimos decenios, después de los trabajos del Prof. César Gómez Campo, tras sus evaluaciones de los materiales clásicos.

Sin embargo, debido a los objetivos de conservación a corto plazo de las semillas para la comercialización, planteadas en este proyecto, la importancia es relativa y solo sería de aplicación durante la conservación de los lotes de semillas de fundamentación (semilla base en sentido agrícola), es decir, para el inicio de cada ciclo de multiplicación, como medida de seguridad, ante eventuales pérdidas de los cultivos.

Para cumplir con estos objetivos, nos remitimos a los textos técnico-científicos de conservación y almacenamiento de germoplasma (semillas) ex situ, entre los que destacamos la obra "Conservación ex situ de plantas silvestres" (**Bacchetta et al., 2008**).

En lo que respecta a la conservación de las semillas a corto plazo para su distribución comercial, tal como se indicado en el apartado anterior, se propone el uso de bolsas termoselladas de aluminio plastificado (foil bags) y sacos de papel, dependiendo de los volúmenes a manejar, y se descartan otros materiales por la imposibilidad de aplicación en volúmenes mayores de los propios de bancos de germoplasma como son los tubos de vidrio cerrados a la llama, los tarros de appertización (kilner o Scotch), frascos de vidrio con tapa de plástico, o latas metálicas termoselladas y plastificadas en su interior.

Dependiendo de los volúmenes a conservar, los tarros de vidrio con cierre hermético a presión, pueden también ser de utilidad para la conservación de pequeños lotes de semillas de fundamentación.

Para la distribución comercial se ha elegido un envase de papel craft cerrado con cola, dentro de una caja de cartón litografiada por dos razones fundamentales y bien distintas.

Por una parte, el papel es permeable a los gases y evita la condensación de humedad dentro de la bolsa, en contacto con las semillas cuando estas cambian de temperatura y humedad relativa en su atmósfera exterior, tanto durante su distribución como exposición comercial. Evitando la condensación de la humedad en su interior y el

incremento de la humedad relativa dentro del envase de la semilla, se prolonga su longevidad.

La segunda razón para la elección de papel craft está relacionada con la eliminación de materiales no reciclables. Un producto comercial que pretende comunicar un mensaje de respeto y conservación medioambiental debe prescindir de cualquier elemento no reciclable como son los plásticos o las bolsas tricapa de polietileno y aluminio.

7. BIBLIOGRAFÍA CONSULTADA

Aamlid, T. S., O. M. eide, B. R. Christie & R. L. McGraw. 1997. Reproductive development and the establishment of potential seed yield in grasses and legumes. In: D. T. Fairey & J. G. Hapton, eds. Forage Seed Production, Volume I: Temperate species, 9-44. CAB International.

Aamlid, T. S., T. N. Haugen, S. ise, A. A. Steensohn & J. S. Torresen. 2011. FJEELFRO: Production of site-specific seed for restoration in mountain areas. Report from the fourth project year 2010. Bioforsk Rapport 6: 1-67.

Aizpuru I. et al. Ed 2015. Claves Ilustradas de la Flora del País Vasco y Territorios Limítrofes. Gobierno Vasco. Departamento de medio ambiente y política territorial.

Amen, R. D. 1966. The extent and role of seed dormancy in Alpine plants. The Quarterly Review of Biology 41: 271-281. EU Commission. 2010. Commission Directive 2010/60/EU of 30 August 2010 providing for certain derogations for marketing of fodder plant seed mixtures intended for use in the preservation of the natural environment. Official Journal of European Union L-228/10.

Aronson, J. & S. Alexander. 2013. Ecosystem restoration is now a global priority: Time to roll up our sleeves. Restoration Ecology 21: 293-296.

Bachetta G., Bueno Sanchez A., Fenu G. Jiménez-Alfaro B., Mattana E., Piotto B. & Virevaire M. (EDS). 2008. Conservación ex situ de plantas silvestres. Principiado de Asturias / La Caiza. 378 pp.

Bakker, J. P. & F. Berendse. 1999. Constraints in the restoration of ecological diversity in grassland and heathland communities. TREE 14: 63-67.

Baskin, C. C. & J. M. Baskin. 1998. Seeds. Ecology, Biogeography and Evolution of Dormancy and Germination. London: Academic Press.

Bischoff, A., L. Crémieux, M. Smilauerova, C. S. Lawson, S., Mortimer, J. Dolezal, V. Lanta, A. R. Edwards, A. J. Brook, M. Macel, J. Leps, T. Steinger & H. Müller-Schärer. 2006. Detecting local adaptation in widespread grassland species – the importance of scale and local plant community. Journal of Ecology 94: 1130-1142.

Bischoff, A., T. Steinger & H. Müller-Schärer. 2010. The effect of plant provenance and intraspecific diversity on the fitness of four plant species used in ecological restoration. Restoration Ecology 18: 338-348.

Bischoff A. 2002. Dispersal and establishment of floodplain grassland species as limiting factors in restoration. Biological Conservation 104: 25-33.

Bueno Sánchez A. & Fernández Prieto J. A., 2003. El jardín Botánico Atlántico. Naturalia Cantabricae 2: 63-66.

Bueno Sánchez A., Jiménez-Alfaro B. & Fernández Prieto J. A., 2007. Prioridades para la flora cantábrica. Perspectivas para la Red Cantábrica de Conservación de Flora. Naturalia Cantabricae 3: 7-13.

Bullock, J. M., R. F. Pywell & K. J. Walker. 2007. Long-term enhancement of agricultural production by restoration of biodiversity. Journal of applied Ecology 44: 6-12.

Duffey, E., M. G. Morris, J. Sheail, L. K. Ward, D. A. Wells & T. C. E. Wells. 1971. Grassland ecology and wildlife management. London: Chapman & Hall.

Edmands, S. 2007. Between a rock and a hard place: evaluating the relative risks of impreeding and outbreeding for conservation and management. Molecular Ecology: 16: 463-475.

Ernst Rieger et al, 2014. Guidelines for native seed production and grassland restoration.

European Commission. 2011. Our life insurance, our natural capital: an EU Biodiversity Strategy to 2020. Communications from the Commission to the European Parliament, the Council, the Economic and Social Committee and the Committee of the Regions. COM (2011) 244 final.

Feucht, B., E. Rieger, C. Tamegger, F. Jahn & I. Jongepierová. 2012. Agricultural propagation of seeds from regional provenance. In: Scotton, M., Kirmer, A., and B. Krautzer, eds. Practical handbook for seed harvest and ecological restoration of species-rich grasslands, 33-38. Cleup Editore, Italy.

Franks, S. J., S. Sim, & A- E- Weis. 2007. Rapid evolution of flowering time by an annual plant in response to a climate fluctuation. Proceedings of the National Academy of Sciences 1004: 1278-1282.

Gálvez Ramírez C. 2002. Almacenamiento y Conservación de Semillas. Material Vegetal de Reproducción: Manejo, Conservación Y Tratamiento. 131-146.

Gómez-Capo C., 2001. La práctica de la conservación de semillas a largo plazo. In: Gómez-Campo C. (ED) Conservación de especies vegetales amenazadas en la región mediterránea occidental. Centro de estudios Ramón Areces, Madrid Spain.

Gómez-Campo C., 2002. Long term seed preservation: the risk of using inadequate containers is very high. Monographs ETSIA, Universidad Politécnica de Madrid 163: 1-10 (Disponible en www.seedcontainers.net).

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

Grime, J. P., G. Mason, A. V. Curtis, J. Rodman, S. R. Band, M. A. G. Mowforth, A. M. Neal & S. Shaw. 1981. A comparative study of germination characteristics in a local flora. Journal of Ecology 69: 1017-1059.

Halsgrübler, P., B. Krautzer, A. Blaschka, W. Graiss, & E. M. Pötsch. 2013. Quality and germination capacity of seed material harvested from an Arrhenatherion meadow. Grass and forage Science. DOI 10.1111/gfs.12063.

Hedberg, P. & W. Kotowski. 2010. New nature by sowing? The current state of species introduction in grassland restoration, and the road ahead. Journal for Nature Conservation 18: 304-308.

Hellmann, Jessica J, & M. Pineda-Krch. 2007. Constraints and reinforcement on adaptation under climate change: selection of genetically correlated traits. Biological Conservation 137: 599-609.

Heywood V.H. & M. E., 2006. In situ conservation of wild plant species: a critical global review of good practices. International Plant Genetic Resources Institute (IPGRI). Technical Bulletin, 11, Rome. 174pp.

Hölzel, N., E. Buisson & T. Dutoit. 2012. Species introduction – a major topic in vegetation restoration. Applied Vegetation Science 15: 161-165.

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

ISTA, 2006. International rules for seed testing. Edition 2006. The International Seed Testing Association (ISTA), Bassersdorf, CH-Switzerland.

Jiménez-Alfaro B., 2008. Biología de la conservación de plantas vasculares en la Cordillera Cantábrica. Prioridades y casos de estudio. Tesis doctoral. Universidad de Oviedo. 274 pp.

Jiménez-Alfaro B., Bueno Sánchez A. & Fernández Prieto J. A., 2007. Valoración de plantas prioritarias en Asturias a partir de un índice de responsabilidad. Naturalia Cantabricae 3: 25-36.

Jongepierová, I., J. Mitchley & J. Tzanopoulos. 2007. A field experiment to recreate species rich hay meadows using regional seed mixtures. Biological Conservation 139: 297-305.

Jordan III W. R., M. E. Giplin & I. D. Aber. Ed. 1987. Restoration ecology: A synthetic approach to ecological research. Cambridge: University Press.

Kiehl, K., A. Kirmer, t. W. Donath, L. Rasran & N. Hölzel. 2010. Species introduction in restoration projects – evaluation of different techniques for the establishment of seminatural grasslands in Central an Northwest Europe. Basic and Applied Ecology 11: 285-299.

Krauzer, B., G. Peratoner, & F. Bozzo. 2004. Site-specific grasses and herbs. Seed production and use for restoration of mountain environments. Plant production and protection series no32. FAO, Rome.

Leimu, R. & M. Fischer. 2008. A meta-analysis of local adaptation in plants. PLoS ONE 3: e4010. Doi: 10.1371/journal.pone.0004010

Marin, M. 2017. Improving seed quality in large-scale production of native seed. University of Pavia.

McKay, J. K., C. E. Christian, S. Harrison, & K. J. Rice. 2005. "How local is local?" – a review of practical and conceptual issues in the genetics of restoration. Restoration Ecology 13: 432-440.

Padilla, F. M. & F. I. Pugnaire. 2006. The role of nurse plants in the restoration of degraded environments. Frontiers in Ecology and the Environment 4: 196-202.

Pywell R. F., N. R. Webb & P. D. Putwain. 1995. A comparison of techniques for restoring heathland on abandoned farmland. Journal of Applied Ecology 32: 400-411.

Rodíguez-Rojo M. P., Fernández-González F., Tichý L. & Chytrý M, 2014. Vegetation diversity of mesic grasslands (Arrhenatheretalia) in the Iberian Peninsula. Applied Vegetation Science 17: 780-796.

Scotton, M., A. Kirmer & B. Krautzer. 2012. Practical handbook for seed harvest and ecological restoration of species-rich grasslands. Padova: Cleup.

Temperton, V. M., R. J. obbs, T. Nuttle & S. Halle. 2004. Assembly rules and restoration ecology: Bridging the gap between theory and practice. Washington, DC: Island Press.

Thompson, K., J. P. Grime & G. Mason. 1977. Seed germination in response to fluctuating temperatures. Nature 67: 147-149.

Török, P., B. Deak, E. Vida, O. Valko, S. Lengyel. & B. Tothmeresz. 2010. Restoring grassland biodiversity: sowing low-diversity seed mixtures can lead to rapid favourable changes. Biological conservation 143: 806-812.

Walker, K. J., P. A. Stevens, D. P. Stevens, J. O. Mountford, S. J. Manchester % R. Pywell. 2004. The restoration and re-creation of species-rich lowland grassland on land formerly managed for intensive agriculture in the UK. Biological Conservation 119: 1-18.

Walker, K. J., D. P. Stevens, J. O. Mountford, S. J. Manchester & R. F. Pywell. 2004. The restoration and re-creation of species-rich lowland grassland on land formerly managed for intensive agriculture in the UK. Biological Conservation 119: 1-18.

Wesche, K., B. Krause, . Culmsee & C. Leuschner. 2012. Fifty years of change in Central European grassland vegetation: Large losses in species richness and animal-pollinated plants. Biological Conservation 150: 76-85.

Enlaces de Interés:

Agricultural Research Service:

www.ars.usda.gov/is/AR/

Biodiversity links:

www.tufts.edu/-cchester/biodiversity.html

Botanic Gardens Conservation International (BGCI):

www.bgci.org-uk/

Center for Plant Conservation:

www.centerforplantconservation.org/

Checklist of online vegetation and plant distribution maps:

www.lib.berkeley.edu/EART/vegmaps.html

European Native Seed Conservation NETwork (ENSCONET):

www.ensconet.com

Food and Agriculture Organization of the Unite Nations (FAO):

www.fao.org

Garantía de Origen y Calidad VWW, Certificado:

www.natur-im-vww.de/zertifikat

Indicadores para la conservación en prados de siega de montaña en el Pirineo Aragonés (Olivia Barrantes, Carlos Ferrer y Ramón Reiné):

https://www.aragon.es/estaticos/GobiernoAragon/Departamentos/MedioAmbiente/Documentos/Areas/Biodiversidad/RedNatura2000/HabitatsInteresComunitario/6510_6520.pdf

International Plant Genetic Resources (IPGR). Genebank Standards:

http://www.fao.org/tempref/docrep/fao/meeting/015/aj680e.pdf

International Phytossanitary portal (IPP): the official web site for the International Plant Protection Convention (IPPC):

www.ippc.int

Jardín Botánico de Córdoba:

www.jardinbotanicodecordoba.com/

Proyecto SALVERE:

www.salvereproject.eu

Royal Botanic Gardens, KEW:

www.kew.org/