

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID
FACULTAD DE CIENCIAS

GERMINACIÓN DE SEMILLAS DE ESPECIES ADAPTADAS A UN MEDIO EXTREMÓFILO: RÍO TINTO

TRABAJO FIN DE GRADO

Madrid 2012-2013

Proyecto realizado por:

LIBE SOLAGAISTUA ZABALA

Tutores académicos:

VICENTA DE LA FUENTE

LOURDES RUFO

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID

FACULTAD DE CIENCIAS

Departamento de Biología

GERMINACIÓN DE SEMILLAS DE ESPECIES ADAPTADAS A UN MEDIO EXTREMÓFILO: RÍO TINTO

TRABAJO FIN DE GRADO

MADRID 2012-2013

Proyecto realizado por:

LIBE SOLAGAISTUA ZABALA

Tutores académicos:

VICENTA DE LA FUENTE

LOURDES RUFO

AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Dña Vicenta de la Fuente y a la Dra. Dña Lourdes Rufo por darme la oportunidad de realizar este proyecto, por tutelarme y darme tantos consejos en todo momento.

A Alejandro por haber estado dispuesto en todo momento a ayudarme.

A todos mis compañeros de Madrid por haberme apoyado mientras hacia el trabajo y por todos los buenos momentos que me han hecho pasar.

A mi familia por todo su apoyo hasta en los periodos más duros.

ÍNDICE:

Resumen	3
Objetivos	3
Introducción	3
Área de estudio	5
Materiales y métodos	9
Semillas	9
Experimentos	10
Análisis estadísticos	12
Resultados	14
Discusión	17
Conclusiones	23
Referencias	24

RESUMEN:

Se presentan los porcentajes de germinación de 12 especies representativas de la vegetación de ribera y matorral del ecosistema del río Tinto en diferentes condiciones de pH (5,4; 3,2; 1,8 y agua del río Tinto). Se observan distintas respuestas de germinación en las especies estudiadas, encontrando los mayores porcentajes de germinación en *Nerium oleander* y *Salicornia ramosissima*. Dada la respuesta positiva de estas dos especies, se discute su utilidad para la restauración de los territorios afectados en los alrededores del río Tinto. Para el resto de especies, se observan bajos porcentajes de germinación y en la mayoría de las especies analizadas el pH no influye en la germinación. Hay muchos factores que limitan la germinación de las semillas tales como la latencia que requiere de un pre-tratamiento (de frío o de calor), variación en las condiciones naturales que son difíciles de recrear en el laboratorio o la baja calidad de las semillas.

OBJETIVOS:

El objetivo de este trabajo es conocer cuales son las especies de plantas autóctonas cuyas semillas pueden crecer en ambientes ácidos y en qué condiciones tienen el mayor porcentaje de germinación. Para esto, se ha seleccionado un número de especies representativas de rivera, marismas y matorral circundante. Todo ello en el marco de un amplio estudio del conjunto sobre la flora y vegetación del río Tinto. Esta información será necesaria en un futuro para la conservación de la flora y restauración de los ecosistemas.

INTRODUCCIÓN:

La Cuenca Minera de Huelva es una comarca vinculada a la explotación de diversas minas asociadas al Río Tinto y alrededores, donde se encuentra el yacimiento de mayor concentración de sulfuros metálicos del mundo (Tornos, 2006).

Históricamente los terrenos recorridos por el río, desde su inicio en la sierra del Padre Caro hasta su desembocadura en Huelva, han sido objeto de una intensa explotación minera que ha tenido como consecuencia importantes impactos ambientales, como la acidificación del suelo y la dispersión de metales pesados propios de la Faja Pirítica Ibérica tales como Fe, Cu, Zn, Ni, As y Pb (Campos et al., 1990; Davis et al., 2000). Sin embargo, se puede destacar el nivel de biodiversidad de este ecosistema. Se conoce la presencia de organismos microbianos que influyen directamente en las características físico-químicas de este medio (Amils et al., 2003). Asimismo, los márgenes del río y el territorio circundante cuentan con una importante biodiversidad de especies y comunidades vegetales (Rufo et al., 2011).

Existen zonas propuestas como Lugares de Interés Comunitario (LIC) en torno al río Tinto: el corredor ecológico del río Tinto y el estuario. Los LIC's forman parte de la Red Natura 2000, que se configura como una red ecológica europea de Zonas Especiales de Conservación (ZEC's). Su creación viene establecida en la Directiva 92/43/CEE del Consejo, relativa a la conservación de hábitats naturales y de la fauna y flora silvestres, conocida como la directiva hábitats. El objetivo de esta Directiva es contribuir y garantizar la biodiversidad mediante la conservación de los hábitats naturales, y de la fauna y flora silvestres calificadas de interés comunitario en el territorio Europeo de los Estados Miembros, mediante el mantenimiento o restablecimiento de los mismos en un estado de conservación favorable.

En el marco de la conservación de la biodiversidad vegetal y de la restauración de territorios afectados por diversas actividades antrópicas, como es el caso que nos ocupa, es necesario el empleo de plantas autóctonas. En este sentido, instituciones como los bancos de semillas y los herbarios juegan un papel esencial en la conservación de esta biodiversidad y como fuentes de obtención de semillas con las que trabajar a distintos niveles.

Para poder mantener y restaurar la riqueza de las especies, es importante saber si los cambios en la acidez del suelo y la disponibilidad de nutrientes influyen en la germinación y establecimiento de plántulas de dichas especies. Con este experimento se ha querido conocer cómo afectan estos factores extremos a la germinación de las semillas para su posterior uso en la restauración de los ecosistemas.

Hasta el momento, los ensayos de germinación de las semillas con pH ácidos sólo se han llevado a cabo con la especie *E. andevalensis*. Los resultados obtenidos en estos experimentos realizados por diversos autores (Aparicio, 1995; Vecino-Bueno et al., 2009; Oliva et al., 2009) han sido en general, poco satisfactorios y poco concluyentes.

Las plantas se pueden reproducir sexual o vegetativamente. La principal diferencia es que en el caso de la reproducción asexual, los descendientes provienen de un único progenitor con la misma carga genética, por lo que se trata de individuos clónicos. En el caso de la reproducción sexual, el material genético de los descendientes proviene de la combinación de los genomas de los progenitores, por lo que la descendencia no tiene la misma información genética y, por tanto, existe un contenido genético con mayor diversidad. Este aspecto es muy importante debido a que las poblaciones clónicas tienen mucha menor capacidad de adaptación ante los cambios de cualquier tipo, no permitiendo la evolución de la especie (Ley Vega Seosane et al., 2007). Este es el motivo por el que es importante utilizar semillas en las restauraciones y por eso se ha realizado el estudio con ellas. Además, se considera que los requisitos de germinación de las plantas reflejan las condiciones favorables para su establecimiento (Cruz et al., 2003).

Las etapas de dispersión de las semillas, su germinación, la dormancia y el establecimiento de las plántulas son fases demográficas clave para comprender la regeneración forestal en condiciones naturales. Sin embargo sabemos poco sobre los requerimientos de regeneración de las especies leñosas mediterráneas en relación con las prácticas de reforestación. Ello se debe a que aún desconocemos mucho de la historia natural básica de nuestros árboles y arbustos (Jornado et al., 2002).

Área de estudio:

El río Tinto es uno de los principales cauces fluviales que cruza la provincia de Huelva (Andalucía, España). Su nacimiento se encuentra en la Faja Pirítica Ibérica, constituida por depósitos masivos volcánicos ricos en sulfuros metálicos, esencialmente pirita (FeS_2), que se presenta acompañada de materiales de pizarra (Tornos, 2006; IGME, 1928-1972). Las diferentes reacciones químicas y biológicas que acontecen sobre estos sustratos, localizados en la cuenca alta del río, determinan el carácter extremadamente ácido de este territorio. El río Tinto es uno de los ejemplos más extensos de ambiente ácido extremo (Amils et al., 2003). El hierro férrico y ácido sulfúrico son los componentes dominantes que se encuentran en este entorno, y junto con los microorganismos, éstos mantienen un sistema de tampón con valores de pH de alrededor de 2,3 a través de los primeros 80 km del río (Amils et al., 2003).

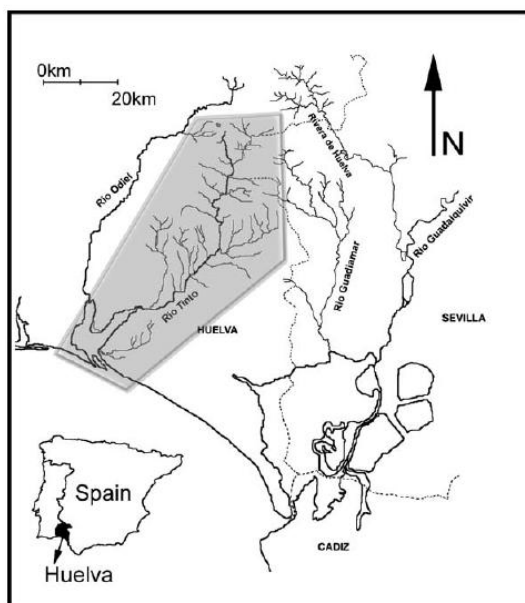


Figura 1: Localización del río Tinto

Biogeográficamente, el río Tinto se encuentra en el reino Holártico, concretamente en la Región Mediterránea, subregión Mediterránea-Occidental (Rivas Martínez et al., 2011). La cuenca alta del río pertenece sobre todo a las provincias Mediterránea Ibérica Occidental (Subprovincia Luso-Extremadurensis, Sector Mariánico-Monchiquense) mientras que su tramo final (estuario) corresponde a la provincia Lusitano Andaluza Litoral (Subprovincia Gaditano Algarviense, Sector Gaditano-Onubense Litoral).

Desde el punto de vista bioclimático el territorio se enmarca en el régimen mediterráneo pluviestacional oceánico, es decir, cada año existe una estación seca en la que, al menos dos meses consecutivos, la precipitación es inferior al doble de la temperatura ($P < 2T$). El termotipo termomediterráneo es el dominante, si bien se pueden encontrar irradiaciones del mesomediterráneo en localidades puntuales debido a la topografía del terreno. El ombrotipo varía desde seco, en las estaciones de los cursos medio y bajo, hasta el subhúmedo-húmedo, en el curso alto (Fuente et al., 2009). El máximo periodo de pluviosidad coincide con los meses de invierno, mientras que en la estación estival se producen periodos de sequía, coincidiendo con las temperaturas más elevadas (Rivas Martínez et al., 2011).

Geomorfológicamente se diferencian tres secciones a lo largo del curso del río. La primera sección corresponde al nacimiento del río y ocupa el área norte desde Peña de Hierro hasta La Palma del Condado. El sustrato de esta sección presenta grandes cantidades de hierro y sulfuro en forma de sulfatos e hidróxidos y el agua es muy ácida. En los márgenes de esta área del río predominan las especies *Erica andevalensis* y *Nerium oleander* en aquellos tramos donde se conserva la vegetación.

En esta zona se ha identificado la asociación *Oenanthe crocatae-Nerietum oleandri*. Esta comunidad vegetal se corresponde con bosquetes ribereños que sufren sequía en los meses de verano donde predomina la adelfa (*N. oleander*) que aparece acompañada de otras especies arbustivas (*Alnus glutinosa*, *Flueggea tinctoria*, *Fraxinus angustifolia*) y representa una de las etapas de sustitución de la aliseda, vegetación potencial de éstas riberas. En los cursos de agua extremadamente ácidos y con elevada carga de metales se reconoce la subasociación *Oenanthe crocatae-Nerietum oleandri ericetosum andevalensis*. Ésta se caracteriza por su pobreza en especies y por la presencia de *Erica andevalensis*, un endemismo acidófilo metalícola que en ocasiones aparece acompañada por *Erica lusitanica* (Rodríguez et al., 2007).



Figura 2: Imagen representativa de una adelfar de la zona con detalle de la flor de adelfa.

El curso medio se extiende desde La Palma del Condado hasta San Juan del Puerto. Tanto el agua como los sustratos mantienen un pH ácido y altas concentraciones de Fe, S, Cu, Zn, As y Pb y bajas concentraciones de macronutrientes. En este tramo predominan los adelfares con la presencia de *Flueggea tinctoria* junto con comunidades gramínoideas (*Phragmites australis*, *Imperata cylindrica*, *Panicum repens*, *Typha domingensis*) de sustitución.

La tercera sección es el estuario que ocupa el área desde San Juan del Puerto hasta Huelva, donde el río Tinto y Odiel se juntan. En este tramo del río el pH del agua, suelos y sedimentos es mayor que en las anteriores, con elevadas concentraciones de S, Fe, As y Pb y las concentraciones más altas de Cu y Zn (Amils, 2003; Rodríguez et al., 2007). Aquí domina la vegetación de marismas con numerosas especies de las familias Chenopodiaceae (*Arthrocnemum macrostachyum*, *Sarcocornia perennis*, *Salicornia ramossissima*, *Halimione portulacoides*) y algunas gramíneas (*Spartina maritima*, *S. densiflora*) propias de este medio.

En los territorios que circundan el río la vegetación potencial corresponde a encinares y alcornoques termófilos, si bien dominan los matorrales de sustitución con elevada presencia de especies de las familias Ericaceae, Cistaceae y Leguminosae.

La flora que compone la vegetación del río Tinto presenta adaptaciones para tolerar la acidez y la alta concentración de metales pesados en el sustrato. En ella encontramos:

- Plantas exclusoras de metales pesados (Fe, Cu, Zn, Ni, As y Pb)
- Plantas bioindicadoras, como por ejemplo *Erica andevalensis* para el Cu.
- Plantas acumuladoras, como (*Imperata cylindrica* para el Fe. (Baker, 1981).

MATERIALES Y MÉTODOS:

1. Semillas

Para el estudio se escogieron una serie de especies representativas del ecosistema del río (ribera, matorral y marisma) excluyendo aquéllas que se multiplican vegetativamente de forma eficaz. Estas semillas se recolectaron en campañas de campo desde 2007 hasta 2012. A continuación se muestran las especies utilizadas en el estudio.

Apocynaceae

Nerium oleander L.

Betulaceae

Alnus glutinosa (L.) Gaertn

Chenopodiaceae

Arthrocnemum macrostachyum (Moric.) Moris

Salicornia ramosissima J. Wood

Sarcocornia perennis (Mill) A.J. Scott

Cistaceae

Cistus albidus L.

Cistus salviifolius L.

Halimium ocymoides (Lam.) Willk

Ericaceae

Erica andevalensis Cabezudo & J. Rivera

Gramineae

Molinia caerulea subsp. *arundinacea* (Schrank) H. Paul

Labiatae

Lavandula viridis L'Her

Leguminosae

Trifolium mutabile Port

2. Experimentos

Las semillas se limpiaron antes de ponerlas a germinar con el fin de facilitar su germinación y evitar la aparición de hongos. Para esto, se quitaron los restos de flores que puedan quedar con la ayuda de pinzas y una espátula.

El material empleado para la germinación fue esterilizado en autoclave previo uso. Se emplearon placas petri de 9cm de diámetro con papel de germinación. Sobre el papel de germinar se colocaron las semillas, procurando que ninguna estuviese junto a otra, hecho que podría afectar su germinación (Figura 2). Cada una de las placas se numeró siguiendo un determinado código para facilitar su posterior identificación. Para el experimento se emplearon 760 semillas correspondientes a 12 especies de 8 familias dispuestas en 44 placas (Tabla 1).

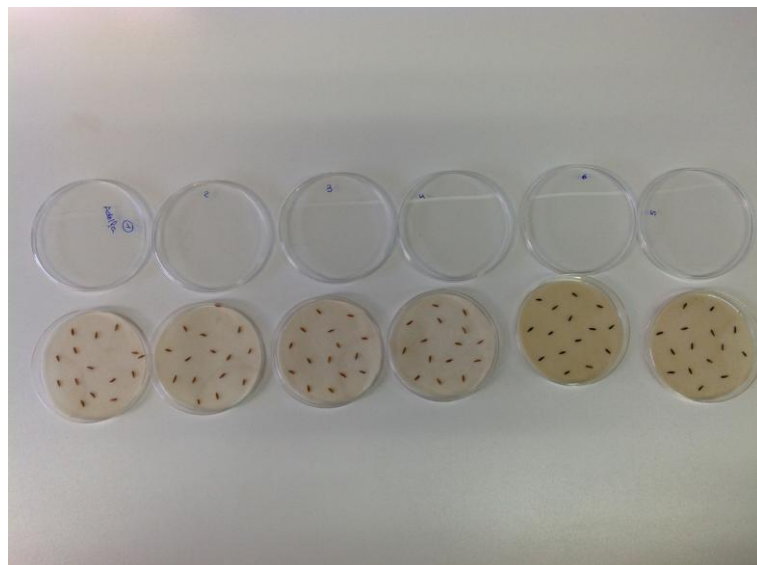


Figura 3: Placas de germinación dispuestas con las semillas de *Nerium oleander*.

Las placas ya preparadas se colocaron en oscuridad y a temperatura ambiental. Se sometieron a distintos tratamientos, hidratándolas con las disoluciones que se indican a continuación:

- Tratamiento A: Hoagland pH= 5,43
- Tratamiento B: Hoagland pH= 3,2
- Tratamiento C: Agua del río Tinto pH= 1,8

-Tratamiento D: Hoagland pH= 1,8

El pH de las disoluciones se midió en movimiento utilizando un pH-metro. La composición de la disolución Hoagland (pH=5,43) es la siguiente: KH_2PO_4 (1ml/l), KNO_3 (5ml/l), $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ (5ml/l), MgSO_4 (2ml/l) y micronutrientes (1ml/l). Después, se acidificó parte de esta disolución hasta llegar a pH=3,2 y pH=1,8 utilizando H_2SO_4 (1M). Estas disoluciones también se esterilizaron.

Todas las especies se sometieron a los tratamientos A y B. Aquéllas que no germinaron en ninguno de los dos casos no se trataron más.

En el caso de *H. ocymoides* y *L. viridis*, plantas del matorral y no de ribera, sólo se sometieron a estos dos tratamientos a pesar de haber germinado.

El tratamiento D sólo se realizó sobre *N. oleander* por varios motivos: esta especie corresponde a las riberas del curso alto y medio del río, es de fácil manejo, respondió positivamente a los tratamientos previos y además, presenta cualidades para su empleo en técnicas de fitorremediación.

Las semillas de *E. andevalensis* se sometieron a los tratamientos A, B y C con un pre-tratamiento de frío como indica Aparicio (1995) con el fin de favorecer su germinación, dada la importancia de esta especie en todo el Andévalo por la endemidad y por ser el brezo principal del paisaje de todo el territorio.

Las semillas se rehidrataron periódicamente con su respectiva disolución. Se retiraron aquellas semillas afectadas por hongos durante el proceso. Los datos de germinación se recogieron diferenciando distintos estadios de germinación:

No germinado: 0

Se rompe la testa: 1

Radícula sin cotiledones: 2

Salen los cotiledones: 3

Apartado por hongo: 4

Para el cálculo de porcentajes de germinación el estadio 1, se rompe la testa, es considerada como semilla germinada.

Tabla 1: Datos correspondientes al número de placas, semillas y tratamientos para cada una de las especies analizadas. Las especies se agrupan en función de su ecología. A: Hoagland pH=5,43; B: Hoagland pH=3,2; C: Agua río Tinto; D: Hoagland pH=1,8.

Ecología	Especie	Tratamiento	nº de semillas/placa	nº de placas
Ribera	<i>A. glutinosa</i>	A	20	1
	<i>A. glutinosa</i>	B	20	1
	<i>E. andevalensis</i>	A	20	3
	<i>E. andevalensis</i>	B	20	3
	<i>E. andevalensis</i>	C	20	3
	<i>M. caerulea</i>	A	20	1
	<i>M. caerulea</i>	B	20	1
	<i>N. oleander</i>	A	10	3
	<i>N. oleander</i>	B	10	3
	<i>N. oleander</i>	C	10	3
	<i>N.oleander</i>	D	10	3
	<i>T. mutabile</i>	A	20	1
	<i>T. mutabile</i>	B	20	1
	Matorral	<i>C. albidus</i>	A	20
<i>C. albidus</i>		B	20	1
<i>C. salviifolius</i>		A	20	1
<i>C. salviifolius</i>		B	20	1
<i>H. ocymoides</i>		A	20	1
<i>H. ocymoides</i>		B	20	1
<i>L. viridis</i>		A	20	1
<i>L. viridis</i>		B	20	1
Marisma	<i>A. macrostachyum</i>	A	20	1
	<i>A. macrostachyum</i>	B	20	1
	<i>A. macrostachyum</i>	C	20	1
	<i>S. perennis</i>	A	20	1
	<i>S. perennis</i>	B	20	1
	<i>S. perennis</i>	C	20	1
	<i>S. ramosissima</i>	A	10	2
	<i>S. ramosissima</i>	B	10	2
	<i>S. ramosissima</i>	C	10	2

3. Análisis estadísticos

Para el análisis de los datos se utilizó el programa Statistica 6.0 (Statsoft Inc., Tulsa, USA). Se analizó la normalidad de los datos utilizando el test Shapiro-Wilk W, asumiendo que cuando el estadístico es significativo la hipótesis de que los datos tienen una distribución normal se rechaza.

En el caso de los datos no paramétricos, la comparación de los valores medios de dos grupos se realizó mediante el test no paramétrico U de Mann-Whitney. Por otro lado, para comparar los valores medios de más de dos grupos se utilizó el test no paramétrico Kruskal-Wallis.

Para los datos con una distribución normal, se utilizó el test paramétrico ANOVA y el test post-hoc Bonferroni.

RESULTADOS:

En el experimento se han obtenido los porcentajes medios de germinación para cada una de las especies analizadas en cada uno de los tratamientos sometidos como se puede observar en la tabla 2. En general, se observan distintas respuestas de germinación en las especies estudiadas.

Tabla 2: Porcentaje medio de germinación de las especies analizadas.

Ecología	Especies	A	B	C	D
Ribera	<i>A. glutinosa</i>	0%	0%	-	-
	<i>E. andevalensis</i>	0%	0%	0%	-
	<i>M. caerulea</i>	0%	0%	-	-
	<i>N. oleander</i>	100%	75%	73%	87%
	<i>T. mutabile</i>	0%	0%	-	-
Matorral	<i>C. albidus</i>	0%	5%	-	-
	<i>C. salviifolius</i>	0%	0%	-	-
	<i>H. ocymoides</i>	5%	5%	-	-
	<i>L. viridis</i>	45%	60%	-	-
Marisma	<i>A. macrostachyum</i>	0%	5%	0%	-
	<i>S. perennis</i>	5%	20%	5%	-
	<i>S. ramosissima</i>	85%	85%	95%	-

Del conjunto de especies analizadas cuya ecología principal es la ribera sólo *N. oleander* presenta una respuesta positiva frente a todos los tratamientos realizados. El porcentaje de germinación de sus semillas es muy alto en los tres tratamientos: en el tratamiento A (Hoagland pH= 5,43) han germinado todas las semillas y en los tratamientos B y C germinan el 75% y el 73%, respectivamente (Hoagland pH=3,2 y agua del río Tinto). En el tratamiento D, las semillas hidratadas con la disolución de Hoagland con pH=1,8, el porcentaje de germinación es mayor que en las dos



condiciones ácidas anteriores, habiendo germinado en este tratamiento un 87% de las semillas. No obstante, aunque los porcentajes de germinación sean del 73% y 87% en las placas C y D, estas plántulas no se desarrollaron correctamente: se rompe la testa y sale la radícula, pero ésta no consigue desarrollarse (Figura 3).

Figura 4: Semilla de *Nerium oleander*. Ha roto la testa y se puede observar la radícula.

Se han observado diferencias estadísticamente significativas entre los porcentajes medios de germinación de las semillas de *N. oleander* en los distintos tratamientos ($p < 0,001$). El porcentaje medio de germinación en el tratamiento A es significativamente superior a todos los demás tratamientos. Por otro lado, los porcentajes medios de germinación en el tratamiento D son estadísticamente superiores a los obtenidos en los tratamientos B y C.

Ninguna de las otras especies de ribereñas, (*A. glutinosa*, *M. caerulea* y *T. mutabile*) germinaron en los tratamientos A y B, por ello no se sometieron a los otros tratamientos.

Las semillas de *E. andevalensis* fueron sometidas a los tratamientos A, B y C pero ninguna de las semillas llegó a germinar.

En lo que se refiere a las especies de matorral, *L. viridis* presenta los porcentajes más altos de germinación ante los dos primeros tratamientos realizados; germinaron el 45% de las semillas sometidas al tratamiento A y el 60% en el tratamiento B (Hoagland con pH=5,43 y pH=3,2, respectivamente).

Las otras tres especies que forman parte de los matorrales, *C. albidus*, *C. salviifolius* y *H. ocymoides* presentan tasas de germinación muy insignificantes, habiendo germinado en los mejores casos el 5% de las semillas.

Entre las especies seleccionadas de la familia Chenopodiaceae, *S. ramosissima* presenta los porcentajes más altos de germinación. Germinaron el 85% de las semillas en los tratamientos A y B (Hoagland con pH=5,43 y pH=3,2 respectivamente) y el 95% de las semillas sometidas al tratamiento C (agua del río Tinto). En este caso, según los resultados obtenidos en placa, el pH ácido no afecta a la germinación de la semilla ($p=0,4$). Por otro lado, *A. macrostachyum* muestra porcentajes de germinación bajos, habiendo germinado sólo en el tratamiento B un 5% de todas las semillas. Las semillas de *S. perennis* germinaron en un 5% en los tratamientos A y C y un 20% cuando se hidrataron con la disolución del tratamiento B (Figura 4).

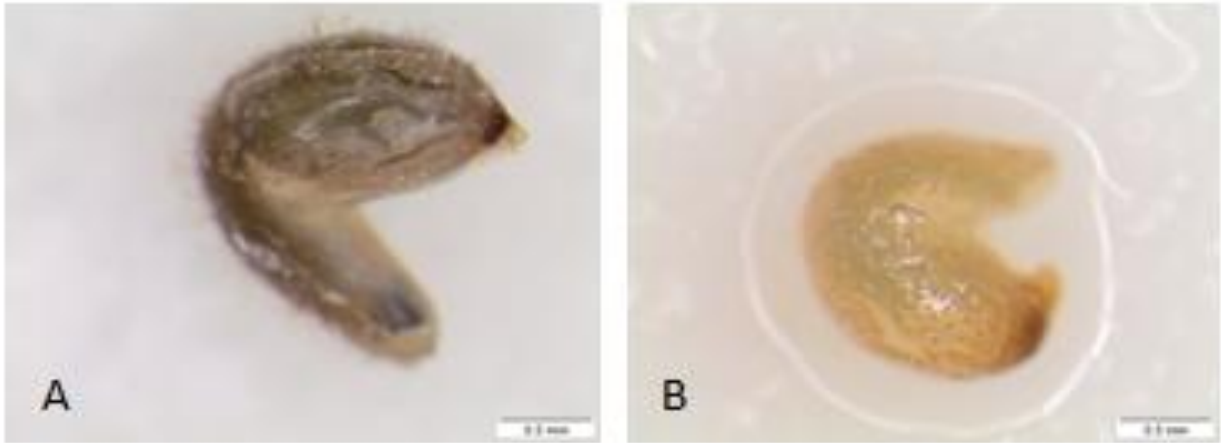


Figura 5: Imágenes representativas de las dos especies de marisma que presentan mayores porcentajes de germinación. A: *Salicornia ramosissima*; B: *Sarcocornia perennis*.

DISCUSIÓN:

Los resultados del experimento indican que las especies estudiadas se comportan de forma diversa en cuanto a su capacidad de germinación. Los mayores porcentajes de germinación se han encontrado en las especies *Nerium oleander* y *Salicornia ramosissima*. Por otra parte, muchas de las especies analizadas no germinaron en las condiciones empleadas. Los distintos comportamientos pueden ser debido a distintos factores: desde la viabilidad de las semillas a la presencia o ausencia de mecanismos de adaptación a diversas variables ambientales.

Nerium oleander es una especie de distribución mediterránea, muy abundante en las riberas susceptibles a sequías estivales del sur de la península Ibérica. En el territorio de estudio preside la comunidad vegetal *Oenantho crocatae-Nerietum oleandri* que presenta una variación en las aguas ácidas y con elevada carga de metales: la subasociación *ericetosum andevalensis*.

Las semillas de esta especie presentan altos porcentajes de germinación en condiciones de pH=5,43. Estos porcentajes de germinación coinciden con los obtenidos por Costinela y Doina (2009), quienes consiguieron germinar entre el 80-100% de las semillas en substrato universal. Las diferencias en los porcentajes de germinación entre las semillas dispuestas en Hoagland pH=5,43 y las otras disoluciones ácidas son estadísticamente significativas. Es decir, la acidez de las aguas afecta al porcentaje de germinación, disminuyendo la capacidad de germinación de las semillas de esta especie. No obstante, estos porcentajes de germinación siguen siendo altos en condiciones ácidas. Por lo tanto, esta especie, debe de tener mecanismos de tolerancia frente a la acidez.

La placa de germinación tratada con agua del río Tinto presenta un porcentaje de germinación significativamente inferior al tratamiento D, a pesar de que en ambos la solución presenta el mismo valor de pH (pH=1,8). Esto parece indicar que la concentración de metales que se encuentran en el agua del río reduce la capacidad de germinación de *N. oleander*, de todos modos el porcentaje de germinación se mantiene por encima del 70%. Estos elevados porcentajes indican que esta especie ribereña, además de tener una alta capacidad para tolerar las aguas extremadamente ácidas, tiene mecanismos que limitan la absorción de los metales pesados.

No obstante, en nuestro experimento, ni en el tratamiento C ni en el D, los que más se asemejan a las características naturales, la plántula ha continuado el crecimiento más allá del desarrollo de la radícula. Este escaso desarrollo contrasta con la presencia de esta especie en los entornos extremadamente ácidos y ricos en metales de las riveras del Río Tinto. Esto puede deberse a que en su entorno natural, ciertos factores medioambientales, como las diferencias en el régimen hídrico, pueden causar que las semillas no se encuentren sometidas constantemente a esta extrema acidez y disponibilidad de metales, permitiendo así el desarrollo de las plántulas hasta las plantas adultas.

La tolerancia que presenta frente a la acidez y concentración de metales (Fe, Cu, Zn, Ni, As y Pb), hace de *N. oleander* una especie adecuada para la fitoestabilización de toda esta zona (Franco et al., 2012). Además, la restauración utilizando *N. oleander* podría aplicarse en toda su área de distribución, con menos problemas que otras técnicas debido a su tolerancia a la sequía, lo que requiere menos inversión en riego que en otras prácticas y favorecer la colonización natural de la zona por otras especies autóctonas (Josa et al., 2012).

Las semillas de las otras especies ribereñas analizadas, *A. glutinosa*, *E. andevalensis*, *M. caerulea* y *T. mutabile*, no han germinado en ninguna de las condiciones. Esto parece indicar que las semillas en estas especies no germinan a pH ácidos.

Erica andevalensis es un endemismo es acidófilo-metalícola, exclusora de algunos metales y bioindicadora del Cu. Gracias a estos mecanismos, dicha especie tiene la capacidad de resistir en suelos con elevadas concentraciones de metales pesados (Rodríguez et al., 2007; Asensi et al., 1999). Además, también presenta flavonoides de gran interés en la medicina, especialmente para la protección gástrica (Reyes et al., 1996).



Figura 6: Ejemplar en flor de *E. andevalensis*

Con el protocolo de germinación que se ha llevado a cabo, las semillas de *E. andevalensis* no germinan en condiciones ácidas. Estos porcentajes de germinación pueden deberse a que la mayoría de las semillas de *E. andevalensis* hayan sido producidas en un estado latente. Las semillas no germinan debido probablemente a un mecanismo fisiológico inhibitorio de la germinación; este mecanismo es el más común en plantas perennes de las zonas templadas (Baskin y Baskin, 1988).

Esta baja tasa de germinación ha sido observada en numerosas ocasiones. Es por esto, por lo que se han llevado a cabo numerosos experimentos con el fin de determinar las condiciones óptimas de germinación para esta especie, como es el caso del estudio de Vecino-Bueno et al., (2009). Observaron que las tasas finales de germinación (con valores de pH entre 2 y 7) oscilaron entre 5-10%, de manera que el porcentaje de germinación aumentaba al incrementar el valor del pH. En otro de los ensayos realizado por Oliva et al., (2009) se sometieron las semillas a múltiples pre-tratamientos (frío, calor e hidratación ácida mediante HCl, adición de nitrógeno al medio mediante nitrato de potasio y nitrato de amonio, adición de ácido giberélico) observando que sólo el ácido giberélico, a partir de una concentración de 100ppm, aumentaba los porcentajes de germinación. A pesar de haber conseguido aumentar el porcentaje de germinación con el uso de GA₃, en estos dos experimentos sólo se analizaron la semillas hasta la ruptura de la testa y su consiguiente aparición de la radícula. Por lo tanto, aunque consiguieron aumentar en cierto nivel los porcentajes de germinación, con estas técnicas no se obtienen plántulas viables, lo cual es indispensable para la restauración.

En la germinación de las semillas de *E. andevalensis* Aparicio (1995) ha obtenido los mejores resultados de germinación mediante el pre-tratamiento de frío en el banco de semillas. En este experimento también tenía un papel muy importante el tiempo de germinación, debido a esto, el estudio de este endemismo excede el tiempo de investigación del que disponemos.

A través de numerosos experimentos se ha observado que las semillas de la especie *E. andevalensis* no germinan en placa con pH ácidos, no obstante, es una especie que crece en zonas de suelos ácidos. Este hecho deja las puertas abiertas a futuras investigaciones acerca de los requerimientos de germinación de esta especie. Se ha estudiado que las Ericáceas necesitan ser micorrizadas por un hongo para germinar, por lo tanto, en investigaciones futuras habría que probar la micorrización de estas semillas con los hongos que se encuentran en los suelos de los alrededores del río Tinto (Perotto et al., 2012).

La información acerca de los requerimientos de germinación de las semillas de *Erica andevalensis* es muy importante debido a que esta especie tiene gran potencial para sus uso en técnicas de fitorremediación en estas zonas mineras (Abreu et al., 2008). Además, esta especie es considerada vulnerable según la IUCN (International Union for the Conservation of Nature), por lo cual su estudio y protección tienen gran importancia.

Prada y Arizpe (2008) sugieren que la calidad de los lotes de las semillas y la capacidad germinativa suelen ser muy bajas en *Alnus glutinosa* debido a que es difícil separar las semillas llenas de las vanas. Las semillas utilizadas en el estudio son procedentes de dos ejemplares situados en los márgenes de la confluencia del río Agrio y Odiel. La escasa calidad del lote de semillas puede haber sido la causa de que ninguna de estas semillas haya germinado en nuestro estudio.

Molinia caerulea es una especie herbácea propia de los prados encharcados situada en los márgenes del río en su nacimiento. Para analizar la germinación de estas semillas Brys et al., (2005) hicieron un estudio de la capacidad de germinación tanto en condiciones naturales como en condiciones de laboratorio. Se emplearon distintos tipos de sustratos (neutro estéril, quemado y no quemado) y se contabilizó el reclutamiento de plántulas durante tres años consecutivos. En ambos casos, tanto en condiciones

naturales como en condiciones de laboratorio, las tasas de germinación son significativamente superiores en sustratos quemados. No obstante, en general, estas tasa de germinación fueron bajas (9,2%). Por lo tanto, el fuego parece influir mientras que el pH ácido no parece afectar en la germinación de las semillas.

Las especies de matorral que se han puesto a germinar presentan diversas respuestas frente a los diferentes tratamientos, pero en general el pH parece no tener efecto en las germinaciones. Las plantas del matorral viven en ecosistemas propensos a incendios. Debido a esto, tienden a producir semillas que se liberan de la latencia sólo después de haber sido expuestos a factores relacionados con el fuego, tales como altas temperaturas, humo, compuestos carbonatados, óxidos de nitrógeno y otros compuestos nitrogenados (Cruz et al., 2003). La ausencia del efecto de incendios en la germinación llevada a cabo en el laboratorio puede ser la razón para explicar las bajas tasas de germinación obtenidas en las especies *C. albidus*, *C. salviifolius* y *H. ocymoides*.

En el caso de las semillas de *C. albidus* se ha observado que requieren un pre-tratamiento de calor para la germinación ya que sus semillas presentan latencia debido a la dureza e impermeabilidad de su cubierta (Thanos y Georghiou, 1988).

Las semillas de *C. salviifolius* son de pequeño tamaño, con una cubierta dura y se encuentra dentro de una cápsula globosa pentagonal. En el estudios de Salvador y Lloret (1995) las semillas fueron sometidas a dos tipos de tratamientos pre-germinativos de calor (70°C/120°C). La temperatura tuvo un efecto significativo en la germinación de las semillas, incrementando los porcentajes de germinación con el tratamiento de 70°C. Los resultados de nuestro estudio pueden haber sido causados por la falta de este tratamiento de calor.

No obstante, se obtuvieron tasas de germinación de 45% en las semillas de la especie endémica *L. viridis* hidratadas con Hoagland pH=5.43 y aumentó este porcentaje hasta un 60% con la disolución más ácida (Hoagland ph=3,2). En esta especie el pH influye en la germinación, aumentando los porcentajes de germinación cuando se acidifica la disolución. Esto puede deberse a que la acidez favorece la ruptura de la testa ayudando así en la germinación. Como en otras muchas especies, en esta tampoco hay estudios acerca de los requerimientos de germinación.

Las especies de la familia Chenopodiáceae con las que se ha trabajado son plantas que crecen en la desembocadura del río Tinto y sus afluentes. En este ambiente, cuando la marea sube el agua del mar se mezcla con el agua del río disminuyendo así la acidez de la zona y permitiendo que crezca la vegetación de marisma. Dos de las especies estudiadas son perennes (*A. macrostachyum* y *S. perennis*) y la otra es anual (*S. ramosissima*). Cuando las semillas de *A. macrostachyum* y *S. perennis* se ponen a germinar con el agua del río Tinto no germinan. Esta baja tasa de germinación en el tratamiento C puede deberse a que en su medio natural las semillas no están constantemente expuestas a las condiciones ácida extremas gracias al efecto de las mareas.

Estos resultados obtenidos en las especies perennes contrastas con los porcentajes de germinación obtenidos con las semillas de la especie *S. ramosissima* (A:85%, B=85%, C=95%). Esto puede ser debido a que esta es una especie terófito, en la época desfavorable sólo perdurarán las semillas. Debido a su ecología esta es una especie muy interesante para la restauración de las marismas.

Fertiberia, líder europea en fabricación de fertilizantes para la agricultura, deposita fosfoyesos en el margen derecho del río Tinto y la fundición Atlantic copper deposita minerales en toda esta zona. Esto ha provocado un gran impacto ambiental en todo el territorio de la desembocadura de los ríos Odiel y Tinto, Huelva. Como consecuencia de estas actividades industriales es una zona que necesita ser restaurada. Teniendo en cuenta los altos porcentajes de germinación obtenidos en este estudio y su ecología, *S. ramosissima* sería muy adecuada para la restauración.

CONCLUSIONES:

- En el experimento se han obtenido diversos porcentajes medios de germinación frente a diferentes condiciones de pH ácidos.
- Entre las especies ribereñas *N. oleander* presenta elevados porcentajes de germinación en todos los tratamientos. En esta especie el pH ácido influye en la germinación: cuanto más ácido es el medio menores porcentajes de germinación se obtienen.
- La elevada concentración de metales que se encuentran en el agua del río reduce la capacidad de germinación de *N. oleander*.
- Las otras especies de ribera (*A. glutinos*, *E. andevalensis*, *M. caerulea*, *T. mutabile*) estudiadas no han germinado en pH ácidos.
- Los datos obtenidos en el experimento indican que las semillas de *E. andevalensis* no germina en pH ácidos en placa.
- Las especies de matorral *C. albidus*, *C. salviifolius* y *H. ocymoides* han presentado bajos porcentajes de germinación (máxima germinación 5%). Un elevado porcentaje de estas semillas no germinan en pH ácido.
- *L. viridis* presenta porcentajes de 45% y 60% en los tratamientos A y B respectivamente. La acidez favorece la ruptura de la testa ayudando así en la germinación.
- Las especies perennes estudiadas de la marisma, *A. macrostachyum* y *S. perennis* presentan bajos porcentajes de germinación a pH ácidos.
- *S. ramosissima* presenta altos porcentajes de germinación en los tratamientos A, B y C. En esta especie el pH ácido no afecta a la germinación en placa. Por su respuesta positiva es una especie idónea para la restauración de las marismas.

REFERENCIAS:

- Abreu, M.M., Tavares, M.T., Batista M.J. (2008). *Potential use of Erica andevalensis and Erica australis in phytoremediation of sulfite mine environments: São Domingos, Portugal*. Journal of geochemical Exploration: 96 210-222.
- Amils, R., González-Toril, E., Fernández-Remolar, D., Gómez, F., Rodríguez, N., Durán, C. (2003). *Interaction of the sulfur and iron cycles, the Rio Tinto case*. Rev. Environ. Sci. & Biotechnol. 1:299-309.
- Aparicio, A. (1995). *Seed germination of Erica andevalensis Cabezudo & Rivera (Ericaceae), an endangered edaphic endemic in southwestern Spain*. Seed Set. & Technol, 23,705-713.
- Asensi, A., Bennet, F., Brooks, R.R., Robinson, B., Stewart, R. (1999). *Copper uptake studies on Erica andevalensis, a metal-tolerant plant from southwestern Spain*. Communication in Soil Science and Plant Analysis, 30 (11-12): 1615-1624.
- Baker, A.J.M. (1981). *Accumulators and excluders-strategies in the response of plants to heavy metals*. J Plan Nutr 3:643-654.
- Baskin, C., Baskin, J.M. (1988). *Germination ecophysiology of herbaceous plant species in a temperate region*. American Journal of Botany, 75,286-305.
- Brys, R., Jacquemyn, H., De Blust, G. (2005). *Fire increases aboveground biomass, seed production and recruitment success of Molinia caerulea in dry heathland*. Acta ecológica 28, 299-305.
- Campos, J.M., Usero, J., Gracia, I. (1990). *Contaminación por metales en los sedimentos del río Tinto*. Tecnología del agua 2º monográfico, 49-56.
- Costinela, S., Doina A. (2009). *Research concerning generative and vegetative propagation on Nerium oleander L*. Journal of Horticulture, Forestry and Biotechnology 13: 306-308.
- Cruz, A., Pérez, B., Velasco, A., Moreno, M. (2003). *Variability in seed germination at the interpopulation, intrapopulation and intraindividual levels of the shrub Erica australis in response to fire-related cues*. Plant ecology 169: 93-103.

- Davis, R.A., Welty, A.T., Borrego, J., Morales, J.A., Pendon, J.G., Ryan, J.G. (2000). *Río Tinto estuary (Spain): 5000 years of pollution*. Environmental Geology 2000; 39: 1107-1116.
- Franco, A., Rufo, L., Fuente, V. (2012). *Metal concentration and distribution in plant tissues of Nerium oleander (Apocynaceae, Plantae) from extremely acidic and less extremely acidic water courses in the Río Tinto area (Huelva, Spain)*. Ecological engineering 47:87-91.
- Fuente, V., Rufo, L., Rodríguez, N. (2009). *Metal accumulation Screening of the Río Tinto Flora (Huelva, Spain)*. Biol Trace Elem Res 134: 318-341.
- I.G.M.E. (1928-1972). *Mapa geológico de España escala 1:50.000*. Hojas: 938-960-982-999. Servicio. Ministerio de Industria y Energía. Madrid.
- Jornado, P., Zamora, R., Marañón, T., Arroyo, J.(2002) *Claves ecológicas para la restauración de bosque mediterráneo. Aspectos demográficos, ecofisiológicos y genéticos*. Universidad de Murcia.
- Josa, R., Jorba, M., Vallejo, V.R. (2012). *Opencast mine restoration in a Mediterranean semi-arid environment: failure of some common practiques*. Ecol. Eng. 42, 183-191.
- Ley Vega de Seosane, C., Gallego, J.B., Vidal, C. (2007). *Manual de restauración de dunas costeras*. Ministerio de Medio Ambiente. Dirección general de costas.
- Oliva, S.R., Leidi, E.O., Valdés, B. (2009). *Germination responses of Erica andevalensis to different chemical and physical treatments*. Ecol Res 24: 655-661.
- Perotto, S., Martino, E., Abbá, S., Vallino, M. (2012). *Genetic diversity and functional aspects of ericoid mycorrhizal fungi*. En: Hock B, editor. The mycota IX. Springer Heidelberg: Fungal associations. 228pp.
- Prada, M.A., Arizpe D. (Coor.) Varios autores. (2008). *Manual de propagación de árboles y arbustos de rivera*. Conselleria de Medio Ambiente, Agua, Urbanismo y Vivienda, Generalitat Valenciana. Valencia. 203pp.

- Reyes, M., Martín, C., Alarcon de la Lastra, C., Trujillo, J., Toro, M.V., Ayuso, M.J. (1996). *Antiulcerogenicity of the flavonoid fraction from Erica Andevalensis Cabezudo-Rivera*. Z Naturforsch 51 (7-8) 563-569.
- Rivas Martínez, S. y coautores (2011). *Mapa de series, geoserias y geopermaseries de vegetación de España [Memoria del mapa de vegetación potencial de España]*. Parte II. Itinera Geobotánica 18: 5-424.
- Rodríguez, N., Amils, R., Jimenez-Ballesta, R., Rufo, L., de la Fuente, V. (2007). *Heavy metal content in Erica andevalensis: an endemic plant from the extreme acidic environment on Tinto River and its soils*. Arid Land Res. Manage. 21: 51-67.
- Rufo, L., Rodríguez, N., de la Fuente, V. (2011). *Plant communities of extreme acidic waters: The Rio Tinto case*. Aquatic Botany 95: 129-139.
- Salvador, R., Lloret, F. (1995). *Germinación en el laboratorio de varias especies arbustivas mediterráneas: efecto de la temperatura*. Universitat autònoma de Barcelona. Orsis 10, 25-34.
- Thanos, C.A., Georghiou, K. (1988). *Ecophysiology of fire-stimulated seed germination in Cistus incanus ssp. creticus (L.) Heywood and C. salviifolius L.* Plant cell Environ 11, 841-849.
- Tornos, F. (2006). *Environment of formation and styles of volcanogenic massive sulfides: The Iberian Pyrite Belt*. Ore Geology Reviews 28: 259-307.
- Vecino-Bueno, I., Redondo-Gómez, S., Figueroa, M. (2009). *Effect of pH on Germination of the endemic Heather, Erica andevalensis*. J. Aquat. Plant Manage. 47.