



# ESTUDIO DE 2 TIPOS DE TRATAMIENTOS DE HYDROPRIMING EN 10 ESPECIES SILVESTRES DE LA PENÍNSULA IBÉRICA

Calatayud, Daniel<sup>1</sup>, Campos, Cristóbal<sup>3</sup> Amorós, Lot<sup>2</sup>,

<sup>1</sup>Asociación Semillistas, Andalucía.

<sup>2</sup>Dronecoria, Open Source Restoration, Andalucía.

<sup>3</sup>Departamento de Química Agroquímica y bioquímica, Universidad de Alicante.



# **Estudio de 2 tipos de tratamientos de hydropriming en 10 especies silvestres de la península ibérica**

Calatayud, Daniel<sup>1</sup>. Campos, Cristóbal<sup>3</sup> . Amorós, Lot<sup>2</sup>.

<sup>1</sup>Asociación Semillistas, Andalucía.

<sup>2</sup>Dronecoria, Andalucía.

<sup>3</sup>Departamento de Química Agroquímica y bioquímica, Universidad de Alicante.

Marzo 2021

## **Resumen:**

La restauración ecológica necesita de una revisión de sus metodologías para hacer frente a los compromisos internacionales de mitigación del cambio climático. Las técnicas de seed priming y seed pelleting son prometedoras para afianzar un método de restauración por siembra directa que supla las deficiencias del método generalizado de plantación de árboles. Se estudiaron los efectos del tratamiento de hydropriming en la germinación de 10 especies mediterráneas. Se utilizaron especies sin latencia y con latencia física y fisiológica. Se emplearon dos diferentes técnicas de hydropriming: a) por control del tiempo de imbibición y b) por control del contenido de humedad. Asimismo, se proponen estrategias para localizar los tratamientos óptimos de priming en especies forestales.

## Índice:

|                                    |           |
|------------------------------------|-----------|
| <b>Resumen:</b>                    | <b>1</b>  |
| <b>Abreviaturas y definiciones</b> | <b>2</b>  |
| <b>Introducción</b>                | <b>3</b>  |
| <b>Contexto del ensayo</b>         | <b>5</b>  |
| <b>Objetivos del ensayo</b>        | <b>7</b>  |
| <b>Métodos y resultados</b>        | <b>8</b>  |
| <b>Conclusiones</b>                | <b>8</b>  |
| <b>Fichas de los ensayos</b>       | <b>10</b> |
| 1.- <i>Pinus halepensis</i>        | 10        |
| 2.- <i>Juniperus phoenicea</i>     | 13        |
| 3.- <i>Arbutus unedo</i>           | 16        |
| 4.- <i>Digitalis obscura</i>       | 17        |
| 5.- <i>Daphne gnidium</i>          | 19        |
| 6.- <i>Genista umbellata</i>       | 20        |
| 7.- <i>Genista spartioides</i>     | 23        |
| 8.- <i>Lavandula stoechas</i>      | 25        |
| 9.- <i>Lavandula latifolia</i>     | 27        |
| 10.- <i>Rumex scutatus</i>         | 28        |
| <b>Bibliografía</b>                | <b>31</b> |

## Abreviaturas y definiciones

**HTI:** hydropriming por control del tiempo de imbibición

**HCH:** hydropriming por control del contenido de humedad

**Umbral:** desde el inicio de la hidratación, el umbral son los días requeridos para el inicio de la germinación (radícula visible).

**THG:** Se calcula:  $(t_{90} - \text{umbral})$  siendo  $t_{90}$  los días requeridos para completar el 90% de las germinaciones. Mide el grado de homogeneización de la germinación de un lote de semillas.

**PG:** prueba de germinación

**%mc:** porcentaje del contenido de humedad (sobre peso fresco) de un lote de semillas

# Introducción

La península ibérica se encuentra en proceso de desertificación. La velocidad a la que se degradan nuestros ecosistemas es mayor que la suma de su regeneración natural y de nuestras acciones de restauración.

Además del esfuerzo de las administraciones públicas, innumerables pequeñas organizaciones plantan árboles cada año. El coste de plantar y regar un número reducido de árboles es alto, con lo que la capacidad de acción de cada organización es pequeña. En el actual contexto de crisis climática es urgente repensar los métodos utilizados para que cada proyecto de reforestación (ya sean instituciones, empresas o asociaciones) pueda, con el mismo esfuerzo, multiplicar el número de árboles/arbustos establecidos.

Plantar planta procedente de alveolo es un método de reforestación que se emplea en prácticamente todos los lugares del planeta. Hay lugares en los que es más eficiente (donde llueve más) que en otros, como el sur de España, donde las lluvias son altas incluso con riegos posteriores. Los problemas de este método son el alto coste y el impacto sobre el ecosistema en la “preparación del terreno” (sobre todo en los grandes proyectos). Además, plantar árboles es un método que tiene origen en la pequeña agricultura y no es una solución escalable al tamaño del problema: reforestar alrededor de 1 billón de hectáreas en todo el planeta (Crowther Lab 2019).

El otro método de reforestación, menos conocido, es la siembra directa de semillas. Tiene dos variantes: la siembra enterrando la semilla y la siembra en superficie (lanzadas a mano o con aeronaves). Este método tiene un amplio abanico de posibilidades, reduce los costes, no tiene impacto ambiental y es mucho más escalable. Pero no se ha logrado controlar la germinación y la predación de semillas, siendo los éxitos de cada proyecto muy variables.

Existe muy poca investigación sobre las formas de hacer viable las siembras directas, en comparación con las inversiones que se han realizado para perfeccionar los métodos de plantación de árboles. El conocimiento necesario para abordar la cuestión de por qué no funciona la siembra directa es amplio y complejo, haciéndose poco accesible a la cultura.

La investigación sobre la germinación de semillas forestales se ha centrado en los tratamientos que precisan los viveros para la producción de planta forestal. En el presente estudio nos referimos a estos tratamientos como protocolos de germinación de referencia. Éstos funcionan bien si podemos controlar las condiciones ambientales, pero no son útiles para trasladarlos a la siembra directa en campo.

Una solución a la viabilidad de los métodos de siembra directa forestal está desarrollándose estos últimos años en distintos lugares del planeta. Se trata de una transferencia tecnológica del ámbito agrario al forestal. Durante las últimas décadas, las inversiones en el estudio del mejoramiento de semillas agrícolas han logrado resultados sorprendentes. Los beneficios de estos mejoramientos en las semillas, tanto agrarias como forestales, son aumentar:

- la velocidad de germinación
- el % de semillas germinadas
- el % de germinaciones a temperaturas no óptimas

- el vigor inicial.
- la resistencia al estrés hídrico y salino

Las técnicas asociadas a estas mejoras son “seed priming” y “seed pelleting”, y tienen el potencial de incrementar el control sobre el éxito de las siembras forestales.

Los tratamientos de priming perfeccionan un conocimiento simple que había pasado inadvertido para la humanidad hasta mediados del siglo XX. Por ejemplo: “para una semilla que tarda 10 días en germinar a 20°C; la ponemos a germinar entre papel húmedo durante 5 días y la secamos; esa nueva semilla seca no ha muerto al secarla en medio de su germinación; esa nueva semilla seca no es la misma internamente, es decir, a realizado cambios internos para prepararse hacia su germinación; si esa nueva semilla seca la volvemos a sembrar, tardará menos de 10 días en germinar y germinará con más vigor”.

El gran problema del control de la germinación de las siembras forestales son las latencias de las semillas forestales. Sembramos semillas de escaramujo y, si nacen, lo harán dentro de varios años. Durante todo este tiempo las semillas están expuestas a la predación. Las técnicas de priming permiten sembrar semillas secas que ya han recorrido su camino hacia la germinación en un laboratorio. Las semillas atraviesan las latencias de manera controlada y son almacenadas hasta el momento de la siembra. Una única lluvia será necesaria para despertar a esas semillas aunque las temperaturas no sean las óptimas para la germinación. De esta manera los tiempos de permanencia de la semilla en el ecosistema se reducen drásticamente, limitándose mucho la predación.

*Seed pelleting* son técnicas de revestimiento de semillas con diferentes materiales. En la terminología popular se les ha llamado: seed balls o bolas de semillas. Con esta técnica se genera un microambiente a la semilla que mejorará el establecimiento. Las semillas se visten con nutrientes, microorganismos, esporas, materiales retenedores de agua, repelentes, etc. El tamaño del revestimiento puede ser fino (p.e. introducir nutrientes o fitosanitarios en semillas agrícolas) o grueso (p.e. para la siembra aérea forestal). La mayor parte de esta tecnología permanece bajo secreto industrial en las grandes multinacionales agrarias.

Desde Dronecoria y Semillistas estamos estudiando la utilización de estas dos técnicas para incrementar el éxito de las siembras directas forestales, tanto enterradas como en superficie.

El presente documento aborda el estudio de los tratamientos de priming de 10 especies forestales del sur-este español: *juniperus phoenicea*, *pinus halepensis*, *arbutus unedo*, *digital obscura*, *daphne gnidium*, *genista umbellata*, *genista spartioides*, *lavandula stoechas*, *lavandula latifolia* y *rumex scutatus*.

Este estudio de laboratorio se complementa con un ensayo de campo, en la que se sembraron 5 de dichas especies en 8 lugares de la península ibérica durante diciembre de 2020, para observar los efectos del uso de semillas imprimadas en la restauración forestal, además de los efectos sobre el uso de plantas nodriza y esporas de ectomicorizas. Este estudio de campo está actualmente en desarrollo y publicaremos los resultados próximamente.

## Contexto del ensayo

Los factores que limitan el establecimiento en campo en proyectos de reforestación por siembra directa de semillas son la reducida emergencia y la predación (Grossnickle 2017). En los ambientes semiáridos del mediterráneo, la irregularidad pluviométrica reduce todavía más la emergencia de las plántulas.

Una forma de aumentar y acelerar la germinación es utilizar semillas a las que se les ha realizado un tratamiento de priming (Sánchez 2018). Esto no sólo puede mejorar la emergencia en campo, en cantidad y previsibilidad, sino que, al acelerar la germinación, disminuye el tiempo que las semillas permanecen expuestas, reduciéndose la probabilidad de que sean predadas.

La literatura científica viene desarrollando las técnicas de priming desde 1973 (Heydecker 1973), sobretudo para semillas de uso agrario. Existen miles de ensayos que han demostrado cómo los tratamientos de priming aceleran y uniformizan la germinación, mejoran la germinación y el crecimiento de la planta en condiciones de temperaturas subóptimas, estrés hídrico y salino, y aumentan el vigor inicial (Heydecker 1977). Su aplicación al ámbito forestal ha estado más limitado, seguramente debido a aspectos de mercado, además de por la inercia, social y institucional, en la utilización de los métodos de plantación de árboles. Se han realizado estudios para la restauración de pastos con semillas nativas y para plantaciones forestales productivas. Pero todavía no se han desarrollado suficientemente metodologías que incluyan las técnicas de priming en la restauración de bosques.

El presente estudio de laboratorio aborda las posibilidades de las técnicas de priming en el mejoramiento de la germinación de 10 especies silvestres del sur-este español (*juniperus phoenicea*, *pinus halepensis*, *arbutus unedo*, *digital obscura*, *daphne gnidium*, *genista umbellata*, *genista spartioides*, *lavandula stoechas*, *lavandula latifolia*, *rumex scutatus*).

Se estudian dos tipos de tratamientos de hydropriming (Sanchez 2018): por control del tiempo de imbibición y por control del contenido de humedad .

El hydropriming por control del tiempo de imbibición (HTI) se basa en iniciar el proceso germinativo de las semillas (hidratándolas), y paralizarlo (secándolas) en un momento concreto para cada especie y temperatura. Mientras una semilla, durante su germinación, permanezca en fase I ó II, puede volverse a secar, sin que su capacidad germinativa se vea reducida. Cada vez que una semilla se hidrata durante un tiempo y se seca antes de fase III, acumula los cambios que la hacen avanzar hacia la germinación, de manera que, tras sucesivas hidrataciones y secados, la semilla podrá germinar en muy poco tiempo. De todas las combinaciones posibles de ciclos de hidratación/secado, algunas introducen las mejoras típicas del priming y son replicables en laboratorio. Aunque el modelo trifásico de germinación no es directamente aplicable a las semillas con latencia, éstas se comportan de igual forma en la naturaleza, avanzando en su proceso germinativo a través de sucesivas fases de hidratación y secado.

El hydropriming por control del contenido de humedad (HCH) se basa en la observación empírica de la existencia de un margen en el contenido de humedad de un grupo de semillas hidratadas que tiene las siguientes características (Rowse 1996):

- por debajo de ese margen las semillas no avanzan en su proceso germinativo. Se encuentran hidratadas pero no inician los procesos metabólicos típicos de la germinación.
- por encima de ese margen las semillas avanzan irremediablemente hacia la germinación, atraviesan la fase II y entran en fase III.
- dentro de ese margen, las semillas activan los procesos metabólicos de la fase II de germinación, pero no pueden germinar: no pueden entrar en fase III.

Mantener un grupo de semillas durante largo tiempo dentro de este margen de contenido de humedad y posteriormente secarlas, deja a esas semillas preparadas para ser sembradas y germinar rápidamente con una sola lluvia. Se siguieron las indicaciones de Jensen (Jensen 2004) para encontrar el margen de contenido de humedad óptimo.

Se tomó como hipótesis de partida para realizar los tratamientos de hydropriming un protocolo de germinación que minimizará el umbral y el THG, para aumentar la homogeneidad de la cercanía de semillas imprimadas a la fase III. En principio tomamos como hipótesis que los tratamientos óptimos de priming tendrían una duración entre la mitad de la fase II y el inicio de la fase III (Sánchez 2018). Estos autores recomiendan estas duraciones para acondicionar (acelerar y uniformizar la germinación, mejorar la germinación en condiciones de estrés térmico o salino) y robustecer (mejorar el vigor y desarrollo de la plántula) la semilla (Orta 1998).

La principal limitación de los tratamientos de priming es el periodo en el que permanecen viables las semillas tras los tratamientos, reduciéndose considerablemente, en comparación con las semillas sin imprimir. El margen seguro de almacenamiento de una semilla imprimada varía en función de la especie y del tipo de tratamiento utilizado. En general, a partir de los 3 meses de almacenamiento tras el tratamiento de priming, se empiezan a reducir los beneficios que aportó el tratamiento. Actualmente, el proyecto VITASEED, de Nelson Garden en Suecia, ha resuelto esta problemática, aunque las limitaciones que introducen las patentes y secretos industriales dificultan hacer uso de su solución para ser utilizada en el ámbito de la restauración ecológica (VITASEED 2019).

Se presentan los resultados sobre las pruebas de germinación en laboratorio de diferentes tratamientos de priming en las 10 especies mencionadas (fichas y tabla de datos adjunta).

El estudio adolece del rigor estadístico habitual dentro del ámbito académico (réplicas de los ensayos, nº mínimo y definido de semillas por ensayo, número de individuos mínimo para la recolección de semilla). Esto se debe a que nuestra organización no todavía cuenta con los recursos económicos necesarios para cumplir esta rigurosidad. Este estudio trata de conciliar estos dos mundos, el académico y el del gestor medioambiental, tan alejados en la realidad de nuestro país.

## Objetivos del ensayo

Se estudiaron los tratamientos de priming en especies silvestres como parte del desarrollo de una metodología de siembra directa forestal que sea efectiva y viable económicamente. En concreto, es necesario aumentar la germinación, y su previsibilidad, en la siembra enterrada en ambientes semiáridos y en la siembra aérea de semillas peletizadas. Además del priming, esta metodología incluye el peletizado, la inclusión de esporas de micorrizas y la siembra bajo nodriza. Técnicas que en su conjunto tratan de imitar los procesos de regeneración natural.

Antes de abordar las técnicas de priming como solución a las limitaciones de las técnicas actuales de siembra directa, estudiamos métodos basados en pregerminar las semillas en laboratorio y sembrarlas en campo justo antes de que empezaran a germinar. El principal problema era la gestión de semillas húmedas y frágiles. Necesitan sembrarse en un momento concreto una vez iniciada su germinación en laboratorio. Si las lluvias no acompañan este momento es necesario retraer la germinación (p.e. incubación en frío) a la espera de las lluvias (Peñuelas 2002). Además, en nuestra experiencia con algunas especies, el cambio de condiciones de laboratorio a campo provoca un “shock” que inhibe la germinación (posiblemente latencias secundarias).

Las técnicas de priming permiten obtener semillas en estado seco a punto de germinar, lo que abre un nuevo campo de posibilidades a la restauración forestal por siembra directa. Se necesita mucho trabajo de laboratorio para desarrollar todo el potencial de los tratamientos de priming en la restauración forestal. Los objetivos de este estudio son iniciar un camino en España para el estudio del *seed enhancement* en la restauración forestal:

- mostrar cómo todas las especies del estudio sin latencia o con latencia física o fisiológica, aceleran y uniformizan su germinación con tratamientos de priming. Algunos tratamientos provocan un ligero aumento o disminución del % de germinación máxima.

En el desarrollo de una metodología de siembra directa en ambientes semiáridos hemos priorizado mejorar el umbral frente al % de germinación máxima, debido a la rápida desecación del suelo tras las lluvias.

En futuros ensayos de germinación queremos mostrar cómo las mejoras introducidas por el priming son más evidentes (y útiles para la siembra directa) en condiciones de temperaturas subóptimas.

- “trazar una hoja de ruta” para el estudio de tratamientos de hydropriming en especies utilizadas en proyectos de restauración forestal. Se trata de encontrar patrones que ayuden a determinar el tratamiento óptimo para cada especie en cada proyecto minimizando el coste en el trabajo de laboratorio.

## Métodos y resultados

Consultar fichas al final del documento y tablas de datos de germinación adjuntas.

## Conclusiones

Para las 10 especies del estudio pudimos encontrar tratamientos de hydropriming que acortan el umbral y homogeneizan la germinación a temperaturas óptimas. Para algunas de las especies es necesario seguir realizando ensayos para localizar la duración del tratamiento óptimo.

Tabla resumen comparativa entre siembra en laboratorio de semilla seca con y sin tratamiento de hydropriming.

|                    | sin tratamiento de priming,<br>germinación a 17°C |        |      |        | Tratamiento de priming,<br>germinación a 17°C |        |      |        |
|--------------------|---------------------------------------------------|--------|------|--------|-----------------------------------------------|--------|------|--------|
|                    | tratamiento                                       | umbral | THG  | % Gmax | tratamiento                                   | umbral | THG  | % Gmax |
| <b>Pino</b>        | Thanos 2000                                       | 7      | 14   | 80     | T7                                            | 3      | 7,5  | 89     |
| <b>sabina</b>      | T0                                                | 13     | 25,5 | 68     | T9                                            | 7      | 15,5 | 76     |
| <b>madroño</b>     |                                                   | -      | -    | -      | T2                                            | 6      | 11   | 59     |
| <b>digital</b>     | T0                                                | 5      | 31,5 | 78     | T3                                            | 5      | 2    | 84     |
| <b>torvizco</b>    | Peñapareja 2006                                   | 5?     | 20   | 71     | T2                                            | 3      | 8    | 66     |
| <b>bolina</b>      | Ac4                                               | 3      | 5,5  | 56     | TP2                                           | 3      | 4    | 79     |
| <b>Spartioides</b> | Ac2                                               | 4      | 4    | 81     | TP2                                           | 2      | 2    | 100    |
| <b>Cantueso</b>    | TP0                                               | 4      | 5    | 48     | TP8                                           | 2      | 4,5  | 84     |
| <b>Latifolia</b>   | T0                                                | 6      | 10   | 86     | T1                                            | 4      | 9    | 64     |
| <b>Rumex</b>       | T0                                                | 3      | 6,5  | 94     | T1                                            | 2      | 4,5  | 88     |

En el intento de esclarecer una metodología para ahorrar esfuerzo en obtener tratamientos óptimos de HTI para especies forestales hemos obtenido las siguientes conclusiones:

- *obtención de protocolo de germinación de referencia.*

El primer paso para obtener tratamientos óptimos de HTI para una especie es encontrar un protocolo de germinación de referencia, que minimice el umbral y el THG. Esto dará lugar a una mayor uniformidad en el estado de las semillas imprimadas.

- *semillas pequeñas y fase III*

La obtención del inicio de la fase III de germinación para cada especie es esencial para estimar la duración de los tratamientos. En semillas grandes (>2mm) la observación de la radícula visible se aproxima al inicio de la fase III. Pero en semillas pequeñas, cuando se observa la radícula, muchas semillas ya están en la fase III. Se requiere experiencia para,

en función de cada especie y la forma de realizar los conteos, estimar el inicio de la fase III a partir de los datos de germinación visible.

*- duración de la estratificación fría*

Excepto para el Pino halep., el resto de especies que requerían (o se benefician del) frío en su protocolo de germinación de referencia, se beneficiaron al acortar la duración de la estratificación fría durante el tratamiento HTI. El frío ralentiza el proceso de germinación de un lote de semillas, haciendo que muchas de ellas se encuentren en fase III sin mostrar la radícula visible. Debido a esto, si incubamos esas semillas tras el periodo de frío de referencia, germinan rápidamente. Pero si las secamos, muchas de ellas mueren. Hemos podido comprobar que una pequeña disminución en la duración del periodo de frío mantiene las semillas en fase II. De esta manera, garantizamos que las semillas imprimadas no han entrado en fase III y mantienen su viabilidad. De todas formas, la experiencia y la literatura nos indica que el tratamiento HCH es el adecuado para las semillas con latencia fisiológica, aunque lo complica.

*- priming en legumbres*

Escarificar las legumbres tiene una mejora significativa en el % de germinación. El tratamiento HTI no introduce grandes beneficios en cuanto a velocidad y homogeneización a temperaturas óptimas, pero posibilita “crear” semillas que germinen cerca del 100%. Esto es así porque las semillas que elegimos para la imprimación son las que ya hincharon, pudiéndose descartar las semillas que no alcanzaron la suficiente imbibición por cribado. Esto posibilita realizar un tratamiento HTI escalonado, es decir, siguiendo un criterio acorde al tiempo que las semillas permanecen hinchadas y no al tiempo de total de imbibición del lote.

*- HTI para cantidades medias de semilla*

Los tratamientos que se realizaron en este estudio fueron para pequeña cantidad de semilla. Para las grandes cantidades que necesita la industria agraria se han desarrollado métodos como el *drum priming*. En el ámbito forestal, para proyectos del orden de centenares de hectáreas, se necesita trabajar con unas pocas decenas de kilogramos de semillas. Estas cantidades medias permiten la utilización de métodos accesibles a pequeñas organizaciones, como el remojo aireado en las semillas sin latencia o estratificación fría con medio (p.e. arena) en las especies con latencia fisiológica.

Nuestros siguientes pasos en el estudio de las técnicas de priming para proyectos de reforestación serán evaluar la viabilidad de la semillas imprimadas tras periodos de almacenamiento; obtener datos de la mejora de la germinación a temperaturas subóptimas; y adaptar el método para mayores cantidades de semilla.

El tratamiento HCH, aunque de mayor complejidad, es prometedor para muchas especies en las que el HTI no sea suficiente. Especies, como *Juniperus phoenicea*, con germinaciones lentas se favorecen de esta técnica. La casi nula literatura científica sobre la aplicación de HCH sobre especies forestales con fuertes latencias hace difícil avanzar en esta dirección.

Dada la facilidad del manejo de los tratamientos HTI, es prometedor su popularización entre los pequeños proyectos de reforestación. Encontrar formas para que los pequeños

proyectos puedan fácilmente incrementar su eficacia es fundamental para realizar una labor distribuida de restauración global de nuestros bosques.

## Fichas de los ensayos

Estas fichas de las 10 especies se complementan con una tabla de datos (.ods) de las pruebas de germinación de los tratamientos.

### 1.- Pinus halepensis

#### *1.1.- Formas de germinación clásicas y propuesta de priming*

El pino carrasco no necesita tratamientos previos para su germinación. Germina entorno al 80% entre la primera y la tercera semana tras la siembra a 20°C (Thanos 2000). Para acelerar y uniformizar la germinación se emplea la siembra en estratificación fría durante un periodo de unos 30 días, previo a la siembra.

Las necesidades de temperatura de germinación se sitúan en un rango estrecho, entre los 15 y los 20°C. Por encima de 20°C o por debajo de 15°C el porcentaje máximo de germinación se reduce drásticamente (Thanos 2000), además de ralentizarla.

Se ensayaron los dos métodos de hydropriming. El hydropriming por control del tiempo de imbibición (HTI) se asoció a la estratificación fría, y se obtuvieron buenos resultados. El hydropriming por control del contenido de humedad (HCH) también se asoció a la estratificación fría, pero no resultó ser un método adecuado.

#### *1.2.- Material y método*

La semilla de pino carrasco procedía del Levante interior, adquirida a Semillas Cantueso (Córdoba).

Resumen de ensayos HTI:

- T0: sin tratamiento de priming. 24 días de estratificación fría + prueba de germinación.
- T1: 24 días de estratificación fría + secado
- T2: 24 días de estratificación fría + secado. Prueba de germinación a temperaturas subóptimas.
- T3: 30 días de estratificación fría + secado
- T4: 30 días de estratificación fría + 3,5 días a 21°C + secado
- T5: 30 días de estratificación fría + 6 días a 21°C + secado
- T6: 30 días de estratificación fría + 8 días a 21°C + secado
- T7: 44 días de estratificación fría + secado

La estratificación fría se realizó en cámara a 4°C ( $\pm 2^\circ\text{C}$ ) sobre papel secante en un recipiente plástico. Las pruebas de germinación (a la salida de la estratificación fría o tras el secado de las semillas imprimadas) se realizaron en cámara a 21°C ( $\pm 2^\circ\text{C}$ ) sobre papel secante en un recipiente plástico, excepto el tratamiento T2 que se realizó en el exterior del laboratorio con temperatura máxima durante el día de 15°C, y de 6°C durante la

noche. Antes de iniciarse la prueba de germinación las semillas se desinfectaron con una solución de hipoclorito de sodio al 2% durante 10'.

Para el conteo de las germinaciones se esperó a que cada radícula empezará a apuntar hacia abajo. En ese momento se rompe la última de las cubiertas y emerge la raíz blanca. Se observó que las semillas secadas con las testas ya abiertas germinaban bien, y con el embrión empezando a elongarse (antes de emerger la raíz blanca) también germinaban pero en menor %.

Para el método HTI las semillas se sembraron entre papel secante y se incubaron en estratificación fría durante diferentes periodos. Al finalizar cada periodo se secaron sobre papel secante en una habitación a 20°C durante dos semanas. Los tratamientos T4, T5 y T6, al salir de la estratificación fría y antes del secado, se mantuvieron a 21°C durante diferentes periodos antes de iniciar el secado.

Para el método HCH se tuvo en cuenta:

- que el máximo de imbibición a las 80 horas de las semillas puestas en remojo fue de 28,9% (%mc fw),
- que %mc (fw) tras 30 días de estratificación en frío, al inicio de la germinación, era de 29,01%,
- que hacia las 17 horas del inicio de imbibición (con remojo) la curva se empezó a aplanar con un 26% %mc (fw).

El proceso fue el siguiente:

1. Pesar cada muestra de semillas.
2. remojar durante 24 horas cada muestra por separado.
3. esterilizar con hipoclorito de sodio al 2% durante 10'.
4. resecado hasta los contenidos de humedad de 18, 20, 22, 24 y 26%, para evaluar el %mc óptimo.
5. introducir cada muestra en bolsas de PEbd de 50 micras sin medio.
6. pesar cada bolsa.
7. estratificar en frío (1-3°C) durante 30 días.
8. cada semana se pesan las bolsas y se restablece el % mc.
9. al finalizar el tratamiento se realizó una siembra sobre papel secante a 17°C y se observó la germinación.

Todos los tratamientos y pruebas de germinación se realizaron en oscuridad.

### **1.3.- Resultados**

La combinación de HTI con estratificación fría dió muy buenos resultados. La referencia que empleamos era Thanos (1986) para la semilla sin tratamiento: germinaciones del 80% con un umbral de 7 días y THG de 14 días. Los mejores tratamientos HTI fueron T5 (umbral de 3 días, THG de 7 días y germinación máxima del 82,9%) y T7 (umbral de 3 días, THG de 7,5 días y germinación máxima del 89,3%).

La combinación de estratificación fría con posterior incubación a temperaturas cálidas da buenos resultados, aunque complica el manejo. Para el caso del pino halepensis el tratamiento HTI se mejora aumentando el periodo de frío. A partir de aquí, los siguientes pasos para lograr un óptimo son realizar tratamientos HTI llegando a los 60 días de

periodo de frío, además de estudiar métodos para mayores cantidades de semilla: estratificación fría en bolsas de PE con un medio de arena y/o turba.

Es interesante una prueba de germinación que se hizo al exterior con  $T^a$  mínimas de  $6^{\circ}\text{C}$  y máximas de  $15^{\circ}\text{C}$ , de semillas con tratamiento HTI de 24 días de periodo de frío seguido de secado (tratamiento de priming no óptimo). Según Thanos, a estas temperaturas la semilla sin tratamiento no germina. Con dicho tratamiento HTI la germinación fue del 55% en 12 días (figura 1.2). Este es un importante motivo para la utilización de tratamientos de priming para la siembra directa forestal, la mejora de la semilla frente a la germinación en temperaturas subóptimas.

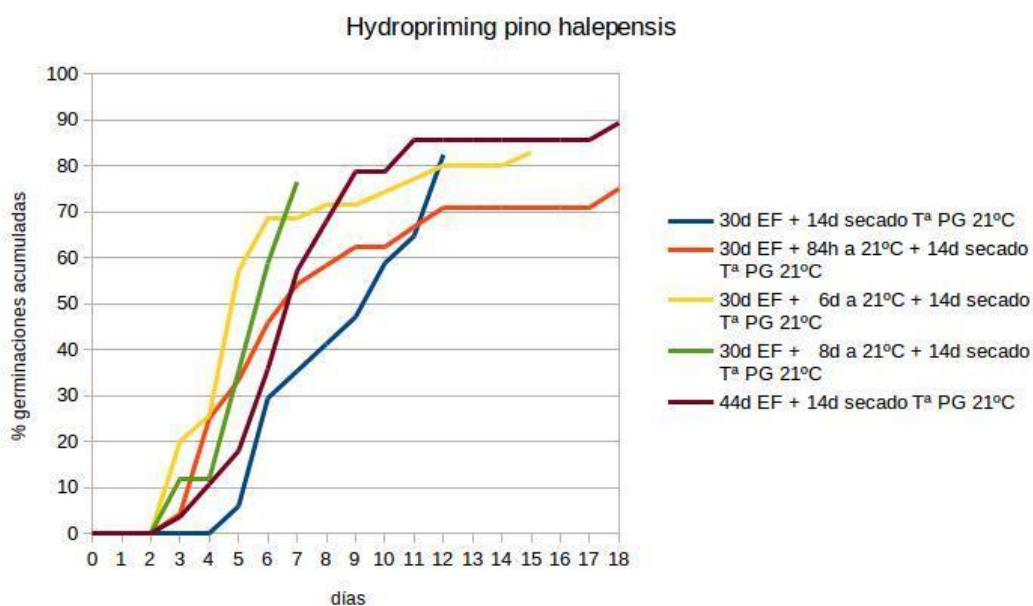
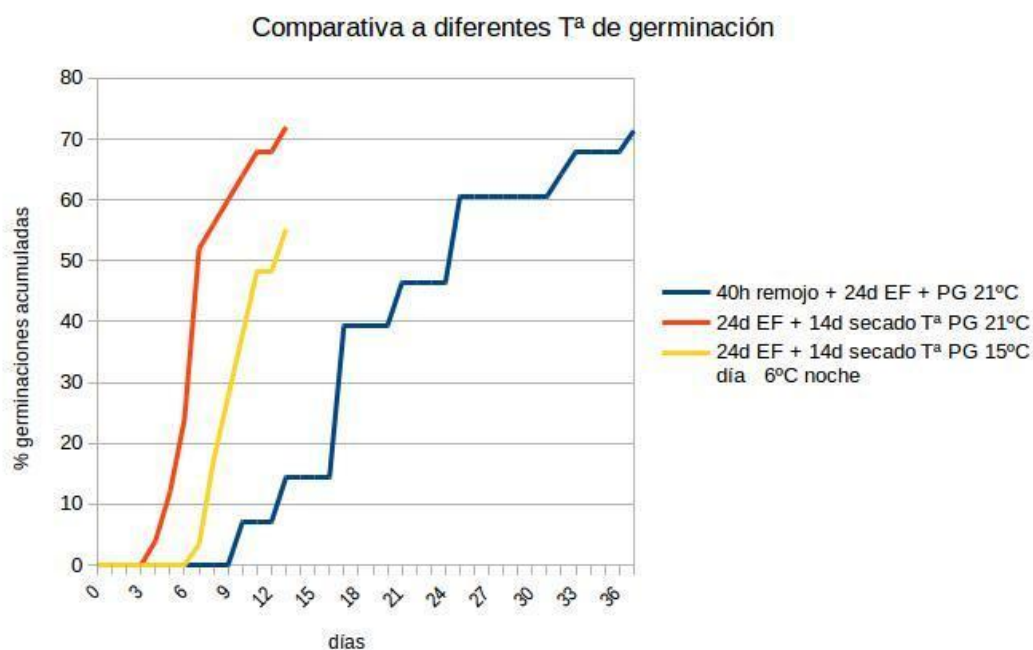


Figura 1.1



Los tratamientos HCH no fueron los acertados. Se obtuvieron bajos % de germinación y sin regularidades. Es posible que se puedan realizar estos tratamientos HCH a temperaturas cálidas en vez de en frío, como ocurrió con la sabina. También es posible que los tratamientos fueran los acertados pero que necesiten un periodo de tiempo larguísimo para hacer avanzar las semillas a través de la fase II.

## **2.- Juniperus phoenicea**

### ***2.1.- Formas de germinación clásicas y propuesta de priming***

La sabina no necesita tratamientos previos para su germinación. Se eligió como tratamiento de germinación de referencia el propuesto por CNRGF El Serranillo: 10' de peróxido de hidrógeno al 8%, así como las recomendaciones de Piotto (Piotto 2001) sobre la temperatura óptima de germinación, alrededor de los 15°C.

Dado que en la germinación de la sabina, su umbral es alto (13 días) y su uniformidad es baja (THG de 25 días), hicimos la hipótesis de que el HTI no obtendría buenos resultados. Por ello, también optamos por el HCH, pero esta vez realizando el tratamiento a 17°C, al no tener evidencias de que la estratificación fría mejora la germinación de la sabina.

### ***2.2.- Material y método***

La semilla de sabina se cosechó en la Serra de Mariola (Alacant) en diciembre de 2019. Se secaron los gálbulos durante 3 meses en una habitación en torno a los 15°C. Se remojaron para la extracción de semilla, se limpiaron, secaron y almacenaron a 4°C hasta las pruebas del ensayo en agosto/septiembre de 2020.

Para la prueba de germinación sin tratamiento de priming se siguieron los siguientes pasos (ensayo T0):

1. Peróxido de hidrógeno al 8% 10', con posterior lavado.
2. Remojo de 25 horas a 17°C.
3. Siembra en papel secante dentro de recipiente plástico en cámara a 17°C ( $\pm 1^\circ\text{C}$ ).

Para realizar el tratamiento de HTI se siguieron los siguientes pasos:

1. Peróxido de hidrógeno al 8% 10', con posterior lavado.
2. Remojo de 48 horas a 17°C.
3. Siembra en papel secante dentro de recipiente plástico en cámara a 17°C ( $\pm 1^\circ\text{C}$ ) durante 11 (ensayo T1) y 13 días (ensayo T2).
4. Secado sobre papel secante en habitación a unos 25°C durante 11/13 días.

Para el método de HCH se tuvo en cuenta:

- que el máximo de imbibición (con remojo) a las 80 horas de remojo fue de 35% (%mc fw),
- que hacia las 20h del inicio del remojo la curva se aplanaba entorno al 30%.

El proceso fue el siguiente:

1. Pesar cada muestra.
2. Peróxido de hidrógeno al 8% 10', con lavado posterior.
3. se remojaron durante 24 horas.
4. se esterilizaron con hipoclorito de sodio al 2% durante 10'.
5. se resecaron hasta los contenidos de humedad de 21, 23, 25, 27 y 29%, para evaluar el %mc óptimo (ensayos T3, T4, T5, T6 y T7 respectivamente).
6. se introdujo cada muestra en bolsas de PEbd de 50 micras sin medio.
7. se pesó cada bolsa.
8. se incubaron a 17°C durante 32 días.
9. cada semana se pesaban las bolsas y se restablecía el % mc.
10. al finalizar el tratamiento, en T3, T4 y T5 la mitad de las semillas se secaron (ensayos T8, T9 y T10 respectivamente), y en la otra mitad, junto con T6 y T7, se realizó una siembra sobre papel secante a 17°C y se observó la germinación.

Para la realización de este ensayo no se encontraron bolsas de PEbd de 100 micras como recomendaba la literatura, por lo que las fluctuaciones del %mc en cada una de las pruebas en cada bolsita fueron considerables, aunque cada semana se restablecía su %mc.

Todos los tratamientos y pruebas de germinación se realizaron en oscuridad.

### ***2.3.- Resultados***

Los resultados del HTI no mejoraron significativamente la germinación (Figura 2.1). Esto apoya nuestra hipótesis de que si en el protocolo de germinación estándar la uniformidad de la germinación es reducida, el método HTI no aporta grandes beneficios. Para confirmarlo habría que hacer otras pruebas con menores duraciones del tratamiento.

### PG a 17°C de hydropriming HTI en *Juniperus phoenicea*

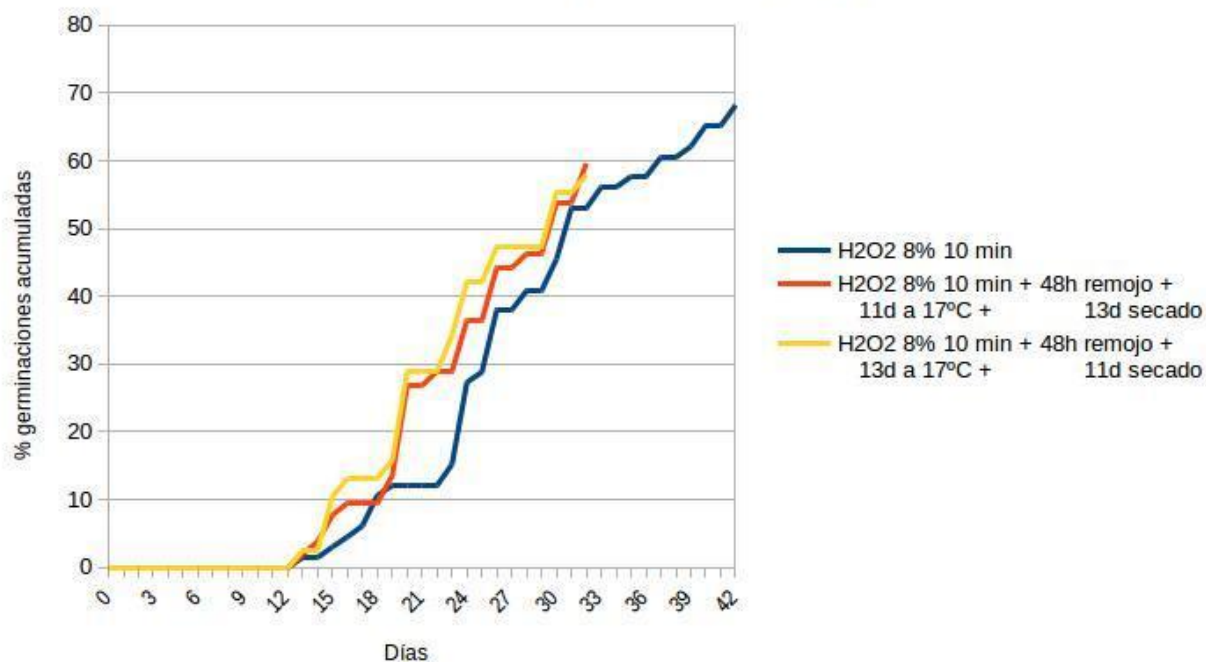


Figura 2.1

En los tratamientos HCH se observaron los resultados en la germinación de las semillas secadas tras el tratamiento. A pesar de que hubo fluctuaciones del %mc de las semillas en el interior de las bolsas de PE, el tratamiento tuvo excelentes resultados en la mejora de la germinación. El umbral disminuyó de los 13 días en la semilla sin priming, a los 7 días en el tratamiento T9. Y la uniformidad de la germinación mejoró de THG=25,5 días sin priming, a THG=15,5 días en el T9. Además el % de germinación máxima aumentó del 68% al 76% (figura 2.2).

Las semillas de los tratamientos T6 y T7 germinaron antes de finalizar el tratamiento. En T8 y T10 se produce un beneficio en el umbral, aunque disminuye el % de germinación máxima. A partir de estos datos creemos que el margen de %mc en el que se avanza en la fase II sin permitir la germinación, se puede situar aproximadamente entre el 20 y el 25%. Debido a las fluctuaciones del %mc en el interior de las bolsas, es necesario realizar otro ensayo que reduzca tales fluctuaciones y pueda encontrarse el %mc óptimo, que podemos estimar alrededor del 23%.

El ensayo también incluyó estos tratamientos pero con una duración de 45 días. Debido a un error en el manejo de las bandejas, la prueba de germinación no se pudo realizar. Pero pudimos observar que pasados 45 días sólo los tratamientos al 27 y 29% germinaban en el interior de las bolsas. Por todo lo anterior, los próximos ensayos deberían de estimar el %mc óptimo entre el 22 y el 24% con duraciones de tratamiento de 45 y 60 días.

Fue interesante observar en el punto 4 del proceso HCH, durante el resecado al %mc para cada bolsa, que la velocidad de secado a partir del 26% se redujo drásticamente. Ese punto coincide con el %mc a partir del cual las semillas germinaron durante el tratamiento. Como hipótesis valdría decir que cuando las semillas, en su proceso de

germinación, disminuyen su %mc por debajo del punto en el que pueden germinar, se resisten a seguir perdiendo humedad. Si esto fuera cierto, observando el resecado de un grupo de semillas hidratadas se podría proponer un margen de estudio más pequeño para encontrar el %mc óptimo, aliviando los costes derivados en la investigación de estos métodos (Jensen 2004).

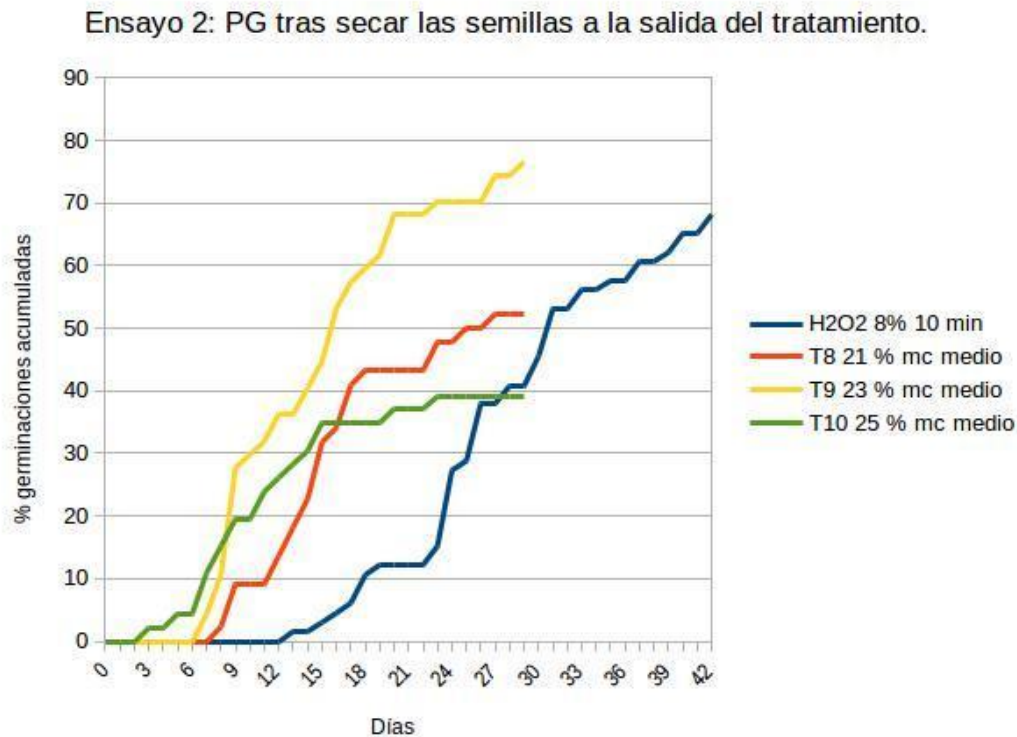


Figura 2.2

### **3.- *Arbutus unedo***

#### ***3.1.- Formas de germinación clásicas y propuesta de priming***

El madroño tiene una leve latencia fisiológica, necesitando tratamientos para la germinación. La germinación en condiciones frías de 4°C es del 100% a lo largo de un periodo de 3 meses (ensayo T0). Si previamente a la germinación a 17°C se realiza una estratificación fría de 2 meses, en 24 días puede lograrse una germinación del 80% (ensayo T1). Estos resultados concuerdan con Fharetin 2004.

Para el tratamiento de hydropriming, optamos por el HTI con estratificación fría, como en el caso del pinus halepensis, al ser este tratamiento uniformador de la germinación. El umbral, tras 59 días de estratificación fría, para empezar a germinar a 17°C era de 7 días. Por eso optamos por una estratificación fría de 2 meses, al final de la cual las semillas estuvieron 3 días a 17°C y posteriormente se secaron. La efectividad de incubar las

semillas, antes del secado, unos días en caliente tras el periodo de frío ya la habíamos comprobado con el *pinus halepensis*.

### **3.2.- Material y método**

Para los tratamientos de hydropriming se utilizaron semillas procedentes de la empresa Semillas Cantueso, recolectadas en Sierra Morena (Córdoba).

Resumen de ensayos:

- T0: sin priming. Prueba de germinación a 4°C
- T1: sin priming. Estratificación fría de 2 meses + prueba de germinación a 17°C
- T2: con priming. Estratificación fría de 2 meses + 3 días a 17°C + secado
- T3: con priming. Estratificación fría de 2 meses + secado
- T4: con priming. Estratificación fría de 2 meses + 3 días a 17°C + secado + almacenamiento 3 meses a 4°C
- T5: semilla con priming. Estratificación fría de 33 días + secado

El tratamiento T2, T3, T4 y T5 se realizó entre papel secante en recipiente plástico, previo remojo de 25 horas y desinfección en lejía al 4% 10', en cámara a 4°C ( $\pm 2^\circ\text{C}$ ). El tratamiento T2 y T4, al salir de la estratificación fría, se incubaron 3 días a 17°C y posteriormente se secaron durante 7 días sobre papel secante en una habitación a 20°C.

T0 y T1 se realizaron sobre papel secante en recipiente plástico, previa desinfección en lejía al 4% 10', en cámara a 4°C ( $\pm 2^\circ\text{C}$ ) y 17°C ( $\pm 1^\circ\text{C}$ ) respectivamente.

El tratamiento HTI fue una primera toma de contacto con esta especie, para observar sus posibilidades con esta técnica tan sencilla de priming.

Todos los tratamientos y pruebas de germinación se realizaron en oscuridad.

### **3.3.- Resultados**

El madroño responde bien a los tratamientos de HTI. El tratamiento T2 empezó a germinar a 17°C en 6 días y completaron la germinación 16 días más tarde. El porcentaje máximo de germinación se redujo al 59,7%, frente al 80% sin priming (figura 3.1).

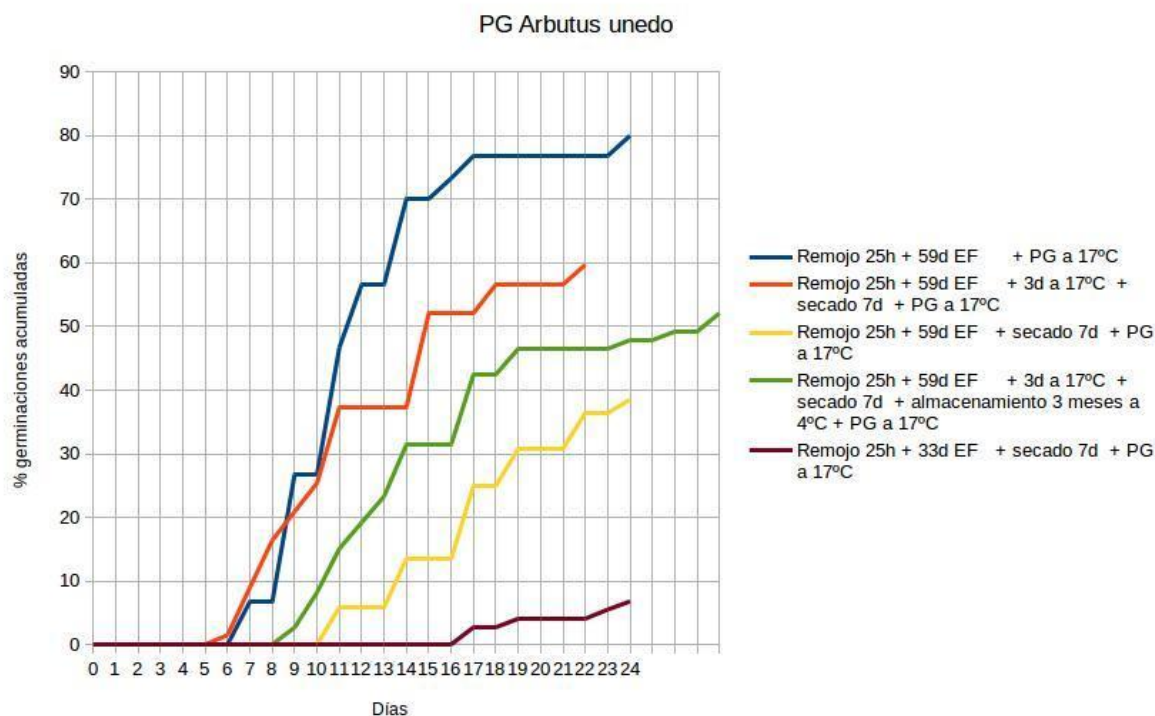


Figura 3.1

El tratamiento T5 no tuvo suficientes días de frío para estimular la germinación de las semillas. Aunque unos días de calor tras los 59 días de frío (T2) mejora la germinación respecto a T3, se reduce considerablemente el % de germinación máxima. Como en el caso de *digitalis obscura*, esto puede ser debido a que dos meses de frío sitúa a muchas semillas en fase III, y el secado destruye su viabilidad.

En este tipo de especies en los que hace falta un tratamiento de frío previo a la germinación, los resultados del HTI son prometedores para su utilización en la siembra directa al poder contar con una semilla seca sin latencia. Hacen falta más pruebas para encontrar la duración óptima de la estratificación fría y, en su caso, de unos días de siembra en caliente previo a la desecación. No creemos que el umbral pueda disminuir mucho más, pero si creemos que la germinación máxima se pueda mejorar. Para ello creemos que basta con reducir un poco el periodo de frío (quizá a 50 días).

Con el tratamiento T4 pudimos comprobar los efectos del almacenamiento de 3 meses de duración sobre la germinación de semillas imprimadas: aumentó el umbral y el THG, y disminuyó el % de germinación máxima.

#### **4.- *Digitalis obscura***

##### ***4.1.- Formas de germinación clásicas y propuesta de priming***

La germinación de la crugía está poco estudiada en la literatura. Se alude a su necesidad de luz y temperaturas altas (Carrión Vilches 2008).

Nuestra experiencia sin ningún tratamiento lleva a germinaciones muy largas, de 50 días con un % de germinación que no llega al 80% (tratamiento T0). La digital es de esas especies que mejora el % y la uniformidad en la germinación si previamente a la siembra en caliente se realiza una estratificación fría de menos de un mes. De esta manera se consiguen germinaciones de casi el 90% en 9 días a 17°C.

Se realizaron tratamientos HTI probándose dos diferentes duraciones de estratificación fría previamente al secado.

#### **4.2.- Material y método**

Las semillas se recolectaron en la localidad de Pitres, en la Alpujarra granadina. Se utilizó un lote del 2018 almacenado al 7% mc(fw) a 4°C ( $\pm 2^\circ\text{C}$ ).

Resumen de los tratamientos:

- T0: sin tratamiento.
- T1: sin priming. Estratificación fría de 30 días + prueba de germinación
- T2: con priming. Estratificación fría de 30 días + secado
- T3: con priming. Estratificación fría de 22 días + secado

Tanto para los tratamientos HTI como para las pruebas de germinación, las semillas se sembraron en papel secante en recipiente plástico. Los tratamientos HTI y la estratificación fría se realizaron en cámara a 4°C ( $\pm 2^\circ\text{C}$ ). El secado de las semillas se realizó inmediatamente después de la estratificación sobre papel secante en habitación a 20°C.

Las temperaturas de las pruebas de germinación variaron en función de la temperatura de la habitación en la que realizaban los ensayos. Sólo la prueba de germinación a 17°C se realizó en cámara a 17°C ( $\pm 1^\circ\text{C}$ ).

Todos los tratamientos y pruebas de germinación se realizaron en oscuridad.

#### **4.3.- Resultados**

Se observó gran diferencia en el % de germinación máxima entre las dos diferentes duraciones de la estratificación fría en los tratamientos de HTI. Comparando el tratamiento de priming de 30 días de estratificación fría con el de un periodo de frío de 22 días, se vio que aumentaba el % máximo de germinación (del 60% al 84%) y la velocidad de germinación ( $t_{90}$  de 11 a 7 días) (Figura 4.1).

Suponemos que el motivo de que se reduzca el % máximo de germinación con una duración de 30 días de periodo de frío es que muchas semillas deben haber entrado en fase III durante el periodo de frío, ya que al terminar este periodo de frío, en semillas sin secar, germinan en sólo 2 días. Con una reducción a 22 días de periodo de frío, las semillas todavía no han entrado en fase III, ya que tras su secado alcanzan un % de germinación similar al alcanzado sin tratamiento de priming.

El momento en que las semillas entran en fase III no es observable a simple vista. El momento irreversible para realizar el secado de semillas, es particular de cada especie. En el caso del pino halepensis podemos secar la semilla acercándonos mucho al momento en que visualmente la radícula está creciendo. En cambio, en las pequeñas

semillas de digitalis, cuando es visible la elongación de la radícula, es probable que las semillas lleven varios días en fase III.

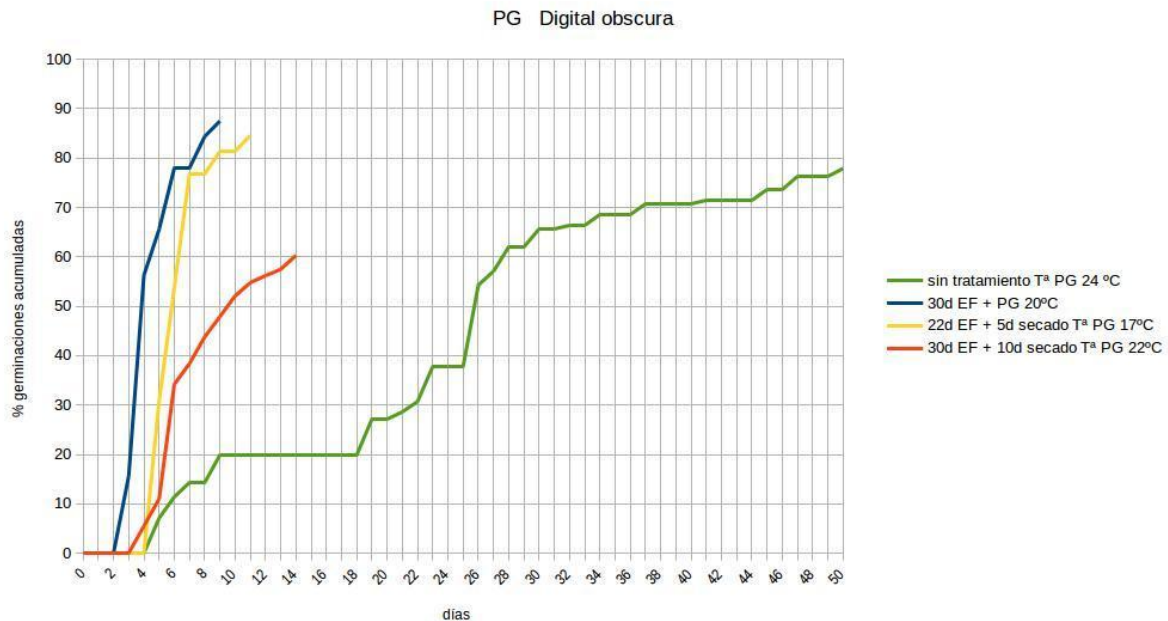


Figura 4.1

## 5.- *Daphne gnidium*

### 5.1.- *Formas de germinación clásicas y propuesta de priming*

El torvisco germina lentamente sin tratamiento alguno. Alcanza germinaciones del 71% en 30 días a 20°C (Peñapareja 2006). Si la germinación se realiza a 5°C se llega al 95% en casi dos meses (tratamiento T0). Si previamente a la siembra en caliente se realiza una estratificación fría de 21 días, germinan el 76% en 9 días a 19°C (tratamiento T1)

El tratamiento elegido fue HTI con un periodo de frío de 21 días.

### 5.2.- *Material y método*

Las semillas se recolectaron en la localidad de Pitres, Alpujarra granadina, de un número reducido de individuos. Dada la dificultad en la recolección de semillas de esta especie, los ensayos se realizaron con pocas semillas.

Resumen de los tratamientos:

- T0: sin tratamiento. Prueba de germinación a 4°C
- T1: sin priming. Estratificación fría de 21 días + prueba de germinación
- T2: con priming. Estratificación fría de 21 días + secado

Tanto los tratamientos de HTI, como las pruebas de germinación, se realizaron sobre papel secante en recipientes plásticos. Los periodos de frío fueron en cámara a 4°C ( $\pm 2^\circ\text{C}$ ). Las siembras en caliente fueron en habitaciones a temperaturas medias de 19 y 21°C.

Para el tratamiento HTI, a la salida de los 21 días de estratificación fría, las semillas se secaron durante 19 días en habitación a 22°C sobre papel secante.

Todos los tratamientos y pruebas de germinación se realizaron en oscuridad.

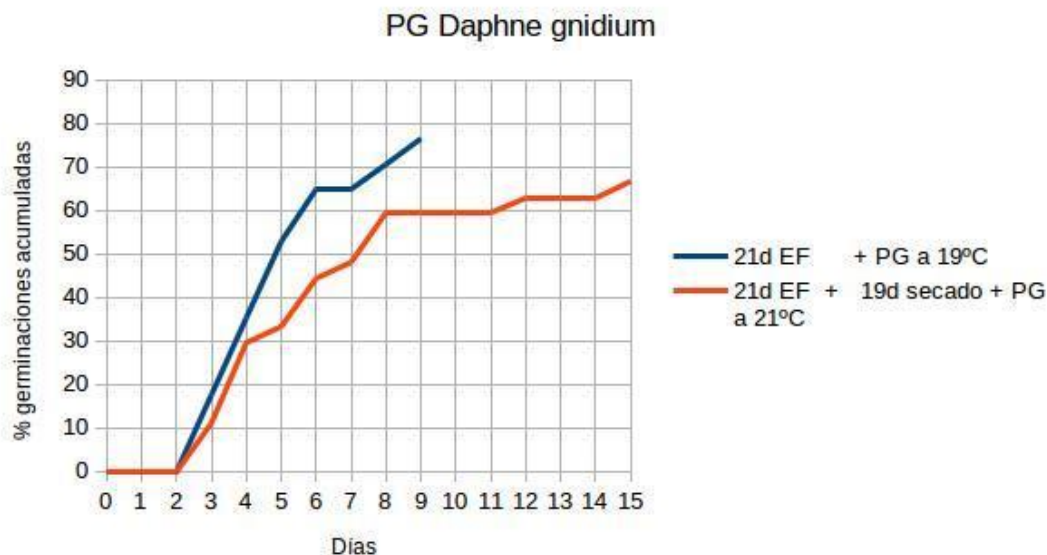


Figura 5.1

### **5.3.- Resultados**

Con el tratamiento HTI de 21 días de periodo de frío, se logró un umbral de 3 días y un % de germinación del 60% al octavo día desde la siembra (figura 5.1). Aun a costa de la pérdida de un pequeño % de germinaciones, respecto a los datos de Peñapareja, el tratamiento HTI aumenta considerablemente tanto el umbral como la uniformidad de la germinación.

Al igual que ocurre con *Digitalis obscura*, es probable que una reducción del periodo de frío antes del secado aumente el % de germinación máxima, debido a que tras 21 días de frío algunas semillas deben encontrarse ya en fase III.

## **6.- *Genista umbellata***

### **6.1.- Formas de germinación clásicas y propuesta de priming**

La bolina tiene una latencia física debido a la impermeabilidad de la cubierta. Para eliminar esta latencia se emplean diferentes métodos basados en calor húmedo o seco, ácido sulfúrico o escarificación mecánica (Pemán 2004).

Se evaluaron los métodos de inmersión en agua caliente y ácido sulfúrico, previamente al desarrollo del tratamiento de hydropriming, para la elección de un protocolo de germinación de referencia que minimizara el umbral y el THG.

El método de agua caliente obtiene buenos resultados en % de germinación (>60%), pero la germinación es muy lenta (>40 días) (Figura 6.1). Estos métodos, por su simplicidad, se usan en viveros forestales, pero no son válidos para realizar tratamientos de hydropriming por su baja uniformidad en la germinación.

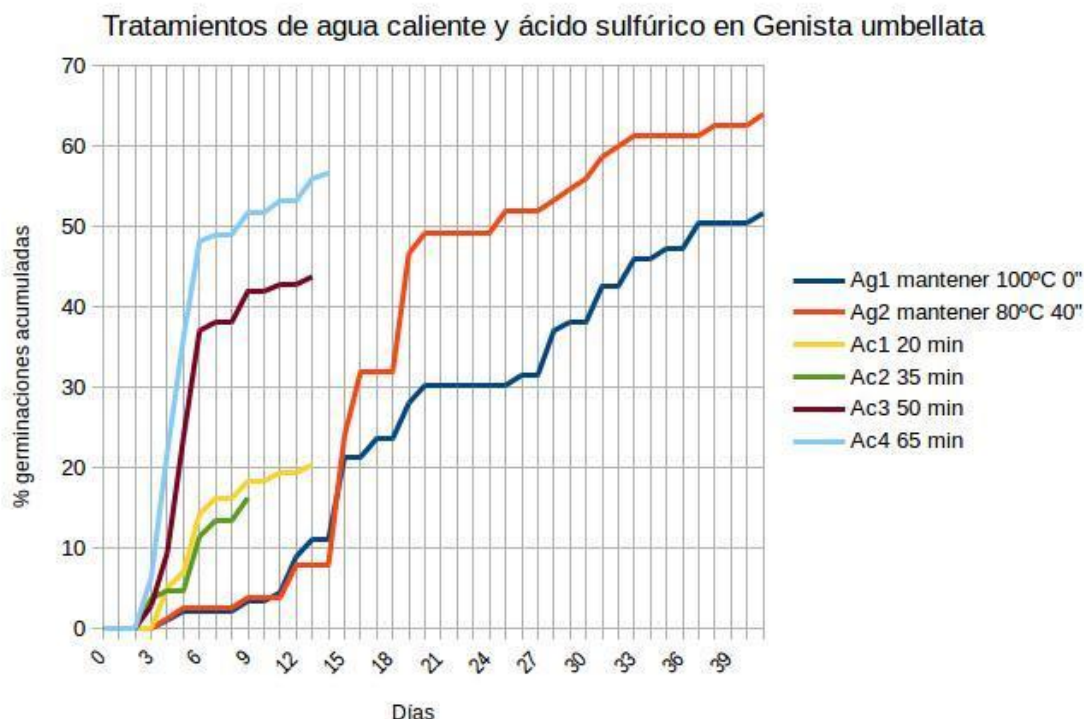


Figura 6.1

Los métodos de ácido sulfúrico mejoran la uniformidad logrando % de germinación similares (para 65' de exposición al ácido, 56,7% de germinación en 14 días) (Figura 6.1). No se aumentaron los tiempos de exposición al ácido debido a que con 65 minutos se observaron dos semillas cuya cubierta se había eliminado por completo dejando ver los cotiledones.

Para el tratamiento de HTI se probaron diferentes tiempos de hidratación (40, 47 y 62 horas). El límite superior eran 72 horas, que corresponde al umbral de la germinación de las semillas sin tratamiento. En todos los casos se pusieron las semillas a remojo 24 horas y seguidamente se sembraron en papel hasta completar cada tiempo de imbibición, después del cual se secaron sobre papel secante en habitación a 20°C.

## 6.2.- Material y método

Las semillas se recolectaron en agosto de 2020 en la localidad de Pitres, Alpujarra granadina.

Resumen de tratamientos:

- Ag1: agua a 100°C y enfriar poco a poco durante 24 horas.
- Ag2: agua a 80°C durante 30 sg y enfriar poco a poco durante 24 horas.
- Ac1: 20 minutos de ácido sulfúrico al 98%.
- Ac2: 35 minutos de ácido sulfúrico al 98%.
- Ac3: 50 minutos de ácido sulfúrico al 98%.
- Ac4: 65 minutos de ácido sulfúrico al 98%.
- TP1: con priming. Ácido durante 65 min + 40 horas de imbibición a 17°C + secado
- TP2: con priming. Ácido durante 65 min + 47 horas de imbibición a 17°C + secado
- TP3: con priming. Ácido durante 65 min + 62 horas de imbibición a 17°C + secado

Para los tratamientos de HTI se realizó primero inmersión en ácido sulfúrico durante 65 minutos, agitando cada 10 minutos. Se lavó bajo chorro de agua y se secaron durante varios días. Cada tratamiento se dejó en remojo 24 horas y seguidamente se sembraron en papel secante hasta completar cada tiempo de imbibición. Todo el proceso se realizó en cámara a 17°C ( $\pm 1^\circ\text{C}$ ). Al finalizar el tratamiento se secaron sobre papel secante en habitación a 20°C durante 12/13 días. La prueba de germinación se realizó sobre papel secante a 17°C ( $\pm 1^\circ\text{C}$ ).

Todos los tratamientos y pruebas de germinación se realizaron en oscuridad.

### 6.3.- Resultados

Como puede observarse en la figura 6.2, tanto el % máximo de germinación, como la velocidad de germinación aumentaron para todos los tratamientos.

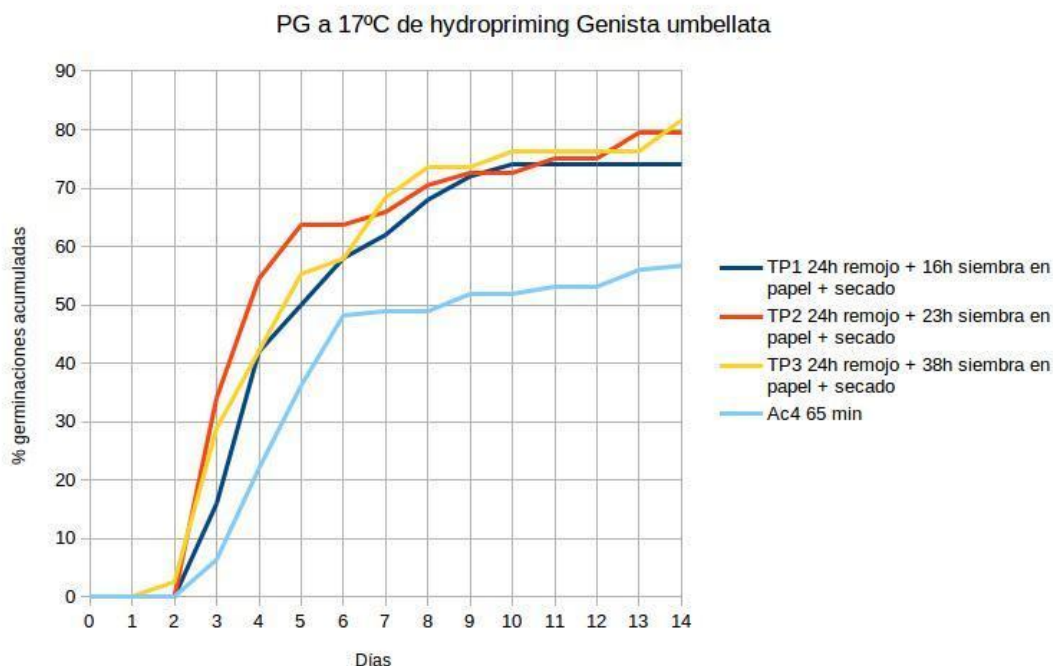


Figura 6.2

Se observó que el % de semillas no hinchadas al finalizar la prueba de germinación era menor que sin tratamiento de hydropriming. No se realizó el conteo de esas semillas no hinchadas, fue una observación subjetiva. Es posible que las semillas que no hincharon durante el tratamiento de hydropriming, sí ablandaran su testa lo suficiente para hidratarse en la prueba de germinación posterior.

Durante la realización de estos ensayos nos dimos cuenta que sólo valía la pena imprimir semillas de bolina que estuvieran hinchadas. De esta manera las semillas que obtengamos tienen un porcentaje altísimo de germinar. Probamos esto con la *G. Spartioides*.

## **7.- *Genista spartioides***

### ***7.1.- Formas de germinación clásicas y propuesta de priming***

La semilla de retama negra tiene latencia física por impermeabilidad de la cubierta. Al igual que la bolina necesita de una escarificación para provocar la germinación.

Se utilizó ácido sulfúrico al 98% para eliminar la cubierta. Se ensayaron 2 tiempos de exposición al ácido, uno de 60 y otro de 90 minutos (figura 7.1). El de 90 minutos superó al de 60', en homogeneidad (THG, 4 días frente a 7) y % de germinación máxima (81% frente a 65%). Debido a esto se eligió el método de 90' para realizar los tratamientos de priming.



Figura 7.1

Debido a las experiencias previas con la bolina, decidimos realizar el tratamiento de priming en remojo aireado y seleccionando para el secado sólo las semillas hinchadas (por cribado). También decidimos no acercarnos demasiado al umbral de las semillas sin tratamiento (96 horas). Se eligieron los siguientes tiempos de tratamiento: 24, 30, 46 y 73 horas.

## **7.2.- Materiales y método**

Las semillas se recolectaron en julio de 2020 en Sierra Lújar (Órgiva, Granada). Un porcentaje altísimo de semillas tenían gorgojos y se descartaron por flotación.

Resumen de tratamientos:

para los tratamientos de HTI se realizó primero inmersión en ácido sulfúrico durante 90 minutos, agitando cada 10 minutos. Se lavó bajo chorro de agua y se secaron durante varios días. Después, las semillas se introdujeron en una bolsa de algodón y se sometieron a remojo aireado a 17°C ( $\pm 1^\circ\text{C}$ ) en cámara. A las 24 horas se sacaron las semillas de la bolsa y se cribaron. Parte de las hinchadas se secaron (TP1). Volvieron al remojo aireado en dos bolsas: una bolsa (2.1) para las semillas que habían hinchado antes de las 24 horas, otra bolsa (2.2) para las que no habían hinchado. A las 30 y 46 horas se secaron (TP2, TP3) parte de las semillas de la bolsa 2.1. A las 48 horas se sacaron las semillas de la bolsa 2.2 y se cribaron. Las semillas hinchadas se secaron (TP4). Las semillas que no estaban hinchadas en la bolsa 2.2, volvieron al remojo aireado 24 horas más. A las 73 horas desde el inicio de remojo las que habían hinchadas en la bolsa 2.2 se secaron (TP5). Las que no estaban hinchadas se descartaron. Para sucesivos ensayos queremos contar esas semillas descartadas para evaluar la pérdida de semilla durante los tratamientos.

Al finalizar el tratamiento se secaron sobre papel secante en habitación a 20°C durante dos semanas. La prueba de germinación se realizó sobre papel secante en cámara a 17°C ( $\pm 1^\circ\text{C}$ ).

Todos los tratamientos y pruebas de germinación se realizaron en oscuridad.

## **7.3.- Resultados**

El tratamiento óptimo resultó ser TP2 con 30 horas de remojo aireado (umbral=2 días; THG=2 días), frente a un umbral de 4 días y THG de 4 días de la semilla sólo con tratamiento de 90 minutos de ácido.

El TP3 con 43 horas de remojo muestra los signos de haber secado con algunas semillas que ya estarían en fase III: adelantan el umbral, aumentan THG y reduce % de germinación máxima.

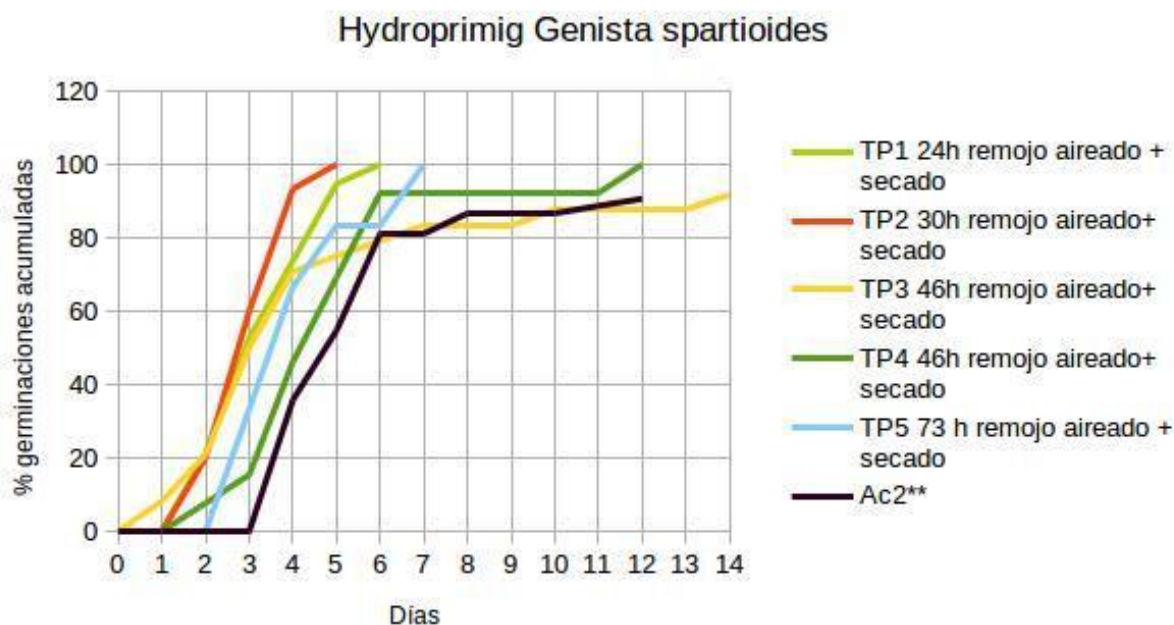
Es posible que las diferencias entre TP1, TP2 y TP3 no sean significativas debido al número reducido de semillas empleadas en cada tratamiento.

Los tratamientos TP4 y TP5 también mejoraron la germinación. Esto hace pensar en un posible protocolo para las legumbres en que se controle el periodo que permanecen hinchadas, no sólo el tiempo total del remojo. Para el caso de la retama negra este protocolo escalonado podría ser:

- inicio remojo aireado
- a las 30 h se criban las hinchadas y se secan. Las no hinchadas siguen a remojo aireado
- a las 60 h se criban las hinchadas y se secan. Las no hinchadas siguen a remojo aireado
- ... y así sucesivamente hasta que dejen de hinchar.

Las semillas individuales del tratamiento TP5 (hinchadas entre las 48 y las 72 horas) son las semillas que más tardarían en germinar si las sembráramos sin tratamiento. Con este HTI escalonado (secando sólo las hinchadas) se puede hacer un hydropriming selectivo de las semillas: las que más tardan en entrar en fase III (son las que más tardan en hinchar) tendrán una duración del tratamiento más larga.

Figura 7.2. Ac2\*\* == Es Ac2 rectificado, sin utilizar en los cálculos las semillas no hinchadas, para comparar con los tratamientos de hydropriming (ver tabla de datos adjunta)



## 8.- *Lavandula stoechas*

### 8.1.- Formas de germinación clásicas y propuesta de priming

El cantueso germina bien y rápido sin necesidad de tratamiento alguno: umbral de 4 días y THG de 5 días a 17°C (tratamiento TP0).

Se realizaron 8 tratamientos HTI de diferentes tiempos de imbibición a 17°C. En un primer momento pretendimos acercarnos al instante en que la radícula es visible para secar las semillas. Como ya nos estaba pasando con el resto de especies de semilla pequeña, la entrada en la fase III no coincide con las primeras radículas visibles. Debido a ello tuvimos que reducir la duración de los tratamientos HTI.

## 8.2.- Material y método

Las semillas se recolectaron en la localidad de Pitres, la Alpujarra granadina, de una gran variedad de individuos. Se utilizaron dos lotes para el ensayo. Las pruebas de germinación sin tratamiento y la primera tanda de pruebas se realizaron con semilla del año 2019. Los siguientes tratamientos (TP5 a TP8) se realizaron con el lote de 2020. Es posible que las diferencias en el % de germinación máxima, entre la semilla sin tratamiento y TP5 a TP8, se deban a ello.

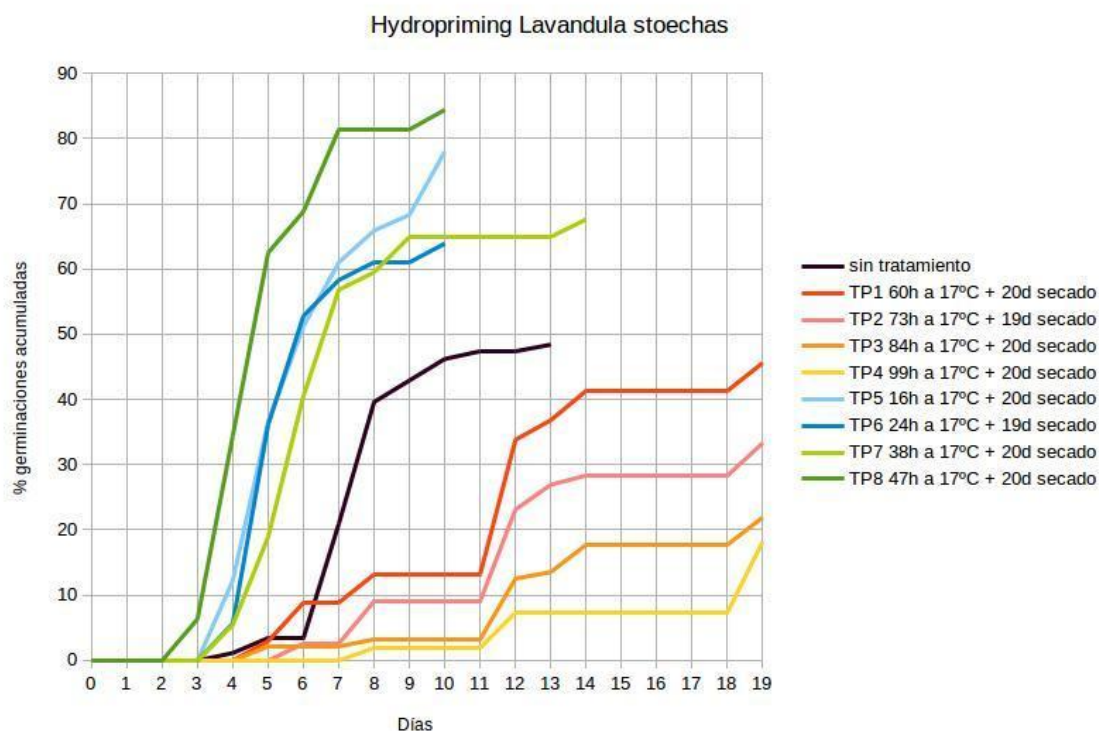


Figura 8.1

Resumen de tratamientos:

- TP0: sin tratamiento
- TP1: con priming. Hidratación de 60 horas + secado
- TP2: con priming. Hidratación de 73 horas + secado
- TP3: con priming. Hidratación de 84 horas + secado
- TP4: con priming. Hidratación de 99 horas + secado
- TP5: con priming. Hidratación de 16 horas + secado
- TP6: con priming. Hidratación de 24 horas + secado
- TP7: con priming. Hidratación de 38 horas + secado
- TP8: con priming. Hidratación de 47 horas + secado

Tanto los tratamientos de HTI, como las pruebas de germinación, se realizaron sobre papel secante en recipientes plásticos en cámaras a 17°C ( $\pm 1^\circ\text{C}$ ). El secado tras cada tiempo de imbibición se realizó en papel secante en habitación a 20°C.

Todos los tratamientos y pruebas de germinación se realizaron en oscuridad.

### **8.3.- Resultados**

Los resultados muestran cómo afecta a la viabilidad de la semilla imprimada el momento en que se elige secar las semillas embebidas.

Puede observarse en la figura 8.1 cómo alrededor de las 50 horas de imbibición las semillas imprimadas reducen su germinación. Esto podría explicarse a partir de que la entrada en la fase III de un % significativo de semillas se produce alrededor de las 50 horas, y todo secado posterior procede una gran mortandad. También puede observarse que el tiempo para empezar a germinar una semilla sin tratamiento es de 4 días, muy superior a la entrada en la fase III (alrededor de 50 horas). Otra vez nos encontramos con la dificultad de situar el inicio de la fase III en semillas pequeñas, mediante la observación de la primera radícula visible.

El incremento de velocidad de germinación de las semillas del tratamiento TP8 respecto a las semillas sin fue de un umbral de 2 días con THG de 4,5 días, frente a umbral de 4 días y THG de 5 días. Debido al cambio de lote de semillas en los diferentes ensayos, no podemos asegurar que el % de germinación máximo también mejorara.

Entre los diversos tratamientos que mejoraron la germinación, los tratamientos de 16 a 38 horas introdujeron ciertos beneficios, pero el óptimo fue de 47 horas, muy cerca del inicio “invisible” de la fase III.

## **9.- *Lavandula latifolia***

### **9.1.- Formas de germinación clásicas y propuesta de priming**

La lavanda germina bien y rápido sin necesidad de tratamiento alguno (umbral de 6 días y THG de 10 días a 17°C). Es más lenta en germinar que el cantueso.

El estudio de esta especie fue de las primeras, y en ella empezamos a observar que acercarse demasiado al instante en que la radícula es visible, es secar semillas en fase III, como nos estuvo pasando con todas las semillas pequeñas.

Se eligieron dos duraciones (5 y 7 días) de tratamientos HTI, en torno a la observación de la radícula visible (6 días).

### **9.2.- Material y método**

Las semillas se recolectaron en Sierra Corona en agosto de 2020, en la localidad de Pitres, Alpujarra granadina, de gran cantidad de individuos.

Resumen de los tratamientos:

- T0: sin tratamiento.
- T1: con priming. Hidratación de 121 horas + secado
- T2: con priming. Hidratación de 165 horas + secado

Tanto los tratamientos de HTI, como las pruebas de germinación, se realizaron sobre papel secante en recipientes plásticos en cámaras a 17°C ( $\pm 1^\circ\text{C}$ ). El secado tras cada

tiempo de imbibición se realizó en papel secante en habitación a 20°C. Para la prueba de germinación sin tratamiento se eliminaron las semillas flotantes, no siendo así para las semillas con tratamiento de priming. Debido a ello no son comparables los % de germinación máxima.

Todos los tratamientos y pruebas de germinación se realizaron en oscuridad.

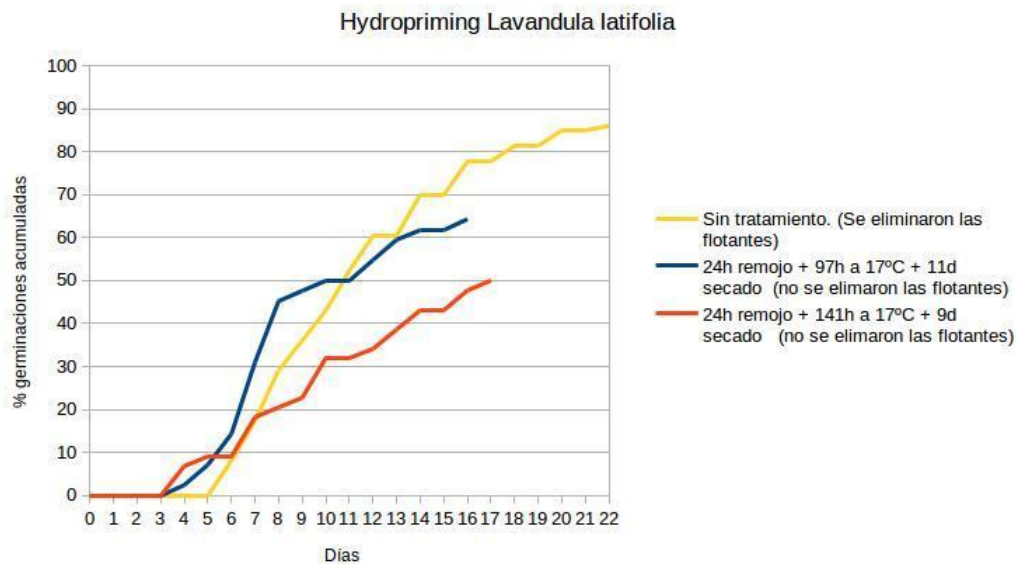


Figura 9.1

### 9.3.- Resultados

Cuando realizamos este ensayo no entendimos por qué no estábamos obteniendo buenos resultados. Con el estudio del resto de especies de semilla pequeña nos dimos cuenta del error de la elección de duraciones del tratamiento próximos al instante de la germinación visible. Se evidencia una vez más la dificultad de encontrar cuándo es el inicio de la fase III en semillas pequeñas.

En la figura 9.1 únicamente podemos observar cómo la elección de duraciones de tratamientos que sobrepasen la entrada en fase III (real, no la radícula visible), tiene un efecto negativo en los parámetros de la germinación.

## 10.- *Rumex scutatus*

### 10.1.- Formas de germinación clásicas y propuesta de priming

La vinagrera germina bien (94,5%) entre 3 y 10 días a 20°C (figura 10.1).

Al tener un umbral tan pequeño y un THG tan bajo, nos propusimos realizar un tratamiento HTI.

## 10.2.- Material y método

Las semillas se recogieron de Pitres, Alpujarra granadina, en julio de 2020. Se limpió la semilla de la envoltura de “papel” que la rodea.

Resumen de tratamientos:

- T0: sin tratamiento.
- T1: con priming. Hidratación de 27 horas + secado
- T2: con priming. Hidratación de 36 horas + secado
- T3: con priming. Hidratación de 49 horas + secado
- T4: con priming. Hidratación de 60 horas + secado

Se eliminaron las semillas flotantes de todos los ensayos (30% de germinación en las semillas flotantes).

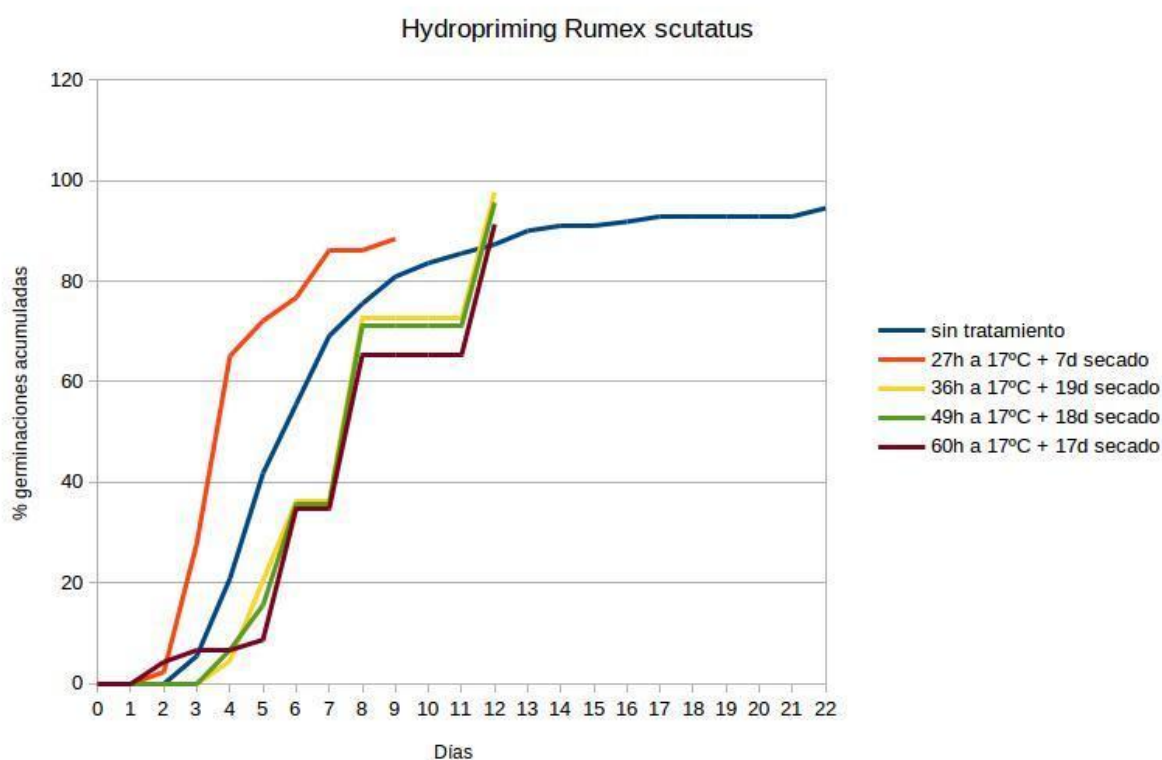
Cada tratamiento se realizó sobre papel secante en cámara a 17°C ( $\pm 1^\circ\text{C}$ ) durante 27, 36, 49 y 60 horas. Posteriormente se secaron sobre papel secante en habitación a 20°C durante 18 días. La prueba de germinación se realizó sobre papel secante en cámara a 17°C ( $\pm 1^\circ\text{C}$ ).

Todos los tratamientos y pruebas de germinación se realizaron en oscuridad.

## 10.3.- Resultados

El tratamiento T1 resultó el más óptimo con un umbral de 2 días y THG de 4.5 días, frente 3 y 6.5 días en la semilla sin tratamiento.

El resto de tratamientos retrasó el umbral y aumentó THG, probablemente debido a que el momento de secado de las semillas habría atravesado la fase III o quedaría muy cerca.



*Figura 10.1*

Es probable que menores tiempos de tratamiento puedan dar mejores resultados. Quizá entre 12 y 24 horas sea el óptimo. Se evidencia que la germinación visible (umbral) en semillas sin tratamiento no es un buen indicador en semillas pequeñas para proponer una duración del tratamiento de hydropriming. Los conteos de las germinaciones en las pruebas de germinación se realizan cada día, así que si el umbral es observado al tercer día después de la siembra, la germinación visible habrá ocurrido entre el segundo y el tercero, y el inicio del desarrollo de la raíz (casi invisible) quizá entre el primer y el segundo día. En la vinagrera, este punto (desarrollo “invisible” de la raíz) debe estar efectivamente entre el primer y segundo día ya que con tratamientos de priming de 36 horas no se obtienen buenos resultados.

## Bibliografía

Crowther Lab 2019. The global tree restoration potential. <https://science.sciencemag.org/content/365/6448/76>

Thanos Costas Á. 2000. Ecology, Biogeography and Management *Pinus halepensis* and *brutia* Forest Ecosystems in the Mediterraneán Basin.

Piotto B. and Anna Di Noi, 2001. Seed propagation of mediterranean trees and shrubs.

Jensen M., 2004. A quick approach to determine the optimal moisture content for controlled dormancy breakage in new tree and shrub species: More knowledge for less money.

Fharetin T., 2004. Improvement in Seed Germination of *Arbutus unedo*

Carrión Vilches M. A., 2008. Especies silvestres mediterráneas con valor ornamental

Peñapareja D.J., 2006. POTENCIAL ORNAMENTAL DE VARIAS ESPECIES AUTÓCTONAS DE LA REGIÓN DE MURCIA

Pemán J. 2004. PRODUCCIÓN Y MANEJO DE SEMILLAS Y PLANTAS FORESTALES.

Steve Grossnickle, Vladan Ivetic. (2017) Direct Seeding in Reforestation-A Field Performance Review

Sánchez Rendón J. A. y Eduardo Furrázola Gómez. (2018) ECOTECNOLOGÍAS PARA LA RESTAURACIÓN ECOLÓGICA: LOS TRATAMIENTOS DE SEMILLAS Y LAS MICORRIZAS.

Heydecker W, J Higgins & RL Gulliver. 1973. Accelerated germination by osmotic seed treatment.

Heydecker W. 1977. Stress and germination. The physiology and biochemistry of seed dormancy and germination.

Rowse HR. 1996. Drum priming

Orta R, JA Sánchez, BC Muñoz & E Calvo. 1998. Modelo de hidratación parcial en agua para tratamientos revigorizadores, acondicionadores y robustecedores de semillas.

Peñuelas J. L. y otros. 2002. EXPERIENCIAS DE APLICACIÓN DE SEMILLADO DIRECTO PARA LA RESTAURACIÓN FORESTAL

VITASEED 2019. <https://cordis.europa.eu/project/id/739254>