



Universidad  
Rey Juan Carlos

**GRADO EN BIOLOGÍA**  
**Curso Académico 2023/24**  
**Trabajo de Fin de Grado**

**EVALUACIÓN DE PÉRDIDA DE VIABILIDAD  
EN SEMILLAS DE *LYSIMACHIA* (PRIMULACEAE)**

**Autor: DAVID SANZ GARCÍA**

**Directores: Francisco Javier Jiménez López y Sonia Merino Mesa**

**Tutores URJC: Francisco Javier Jiménez López y Sonia Merino Mesa**

# INDICE

<b>RESUMEN.....</b>	<b>2</b>
<b>INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>2</b>
<b>MATERIALES Y METODOS.....</b>	<b>5</b>
<b>2.1. Especies de estudio.....</b>	<b>5</b>
<b>2.2 Diseño experimental.....</b>	<b>5</b>
<b>2.3. Análisis estadísticos.....</b>	<b>9</b>
<b>RESULTADOS.....</b>	<b>10</b>
<b>3.1 Porcentaje de germinación.....</b>	<b>10</b>
<b>3.2 Tiempo de germinación.....</b>	<b>11</b>
<b>3.3 Porcentaje de supervivencia.....</b>	<b>12</b>
<b>3.4 Tasa de supervivencia.....</b>	<b>13</b>
<b>3.5 Biomasa.....</b>	<b>14</b>
<b>3.6 Tiempo de floración.....</b>	<b>15</b>
<b>DISCUSIÓN.....</b>	<b>18</b>
<b>CONCLUSIONES.....</b>	<b>20</b>
<b>AGRADECIMIENTOS.....</b>	<b>21</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>21</b>

## RESUMEN

En este trabajo se evalúa el efecto del tiempo de almacenamiento de las semillas sobre la efectividad biológica de dos especies de plantas de la familia Primulaceae, *Lysimachia arvensis* y *Lysimachia loeflingii*. Para ello, se sembraron semillas de 48 poblaciones, representativas de la distribución cosmopolita de estas especies, y almacenadas en distintos tiempos (desde 6 a 15 años). Se analizó el peso, el porcentaje y tiempo de germinación de las semillas, así como el porcentaje de supervivencia, tasa de supervivencia y días hasta la floración de las plantas cultivadas en invernadero, además del tiempo de supervivencia de las plantas no florecidas hasta su senescencia. Utilizando modelos lineales mixtos, comprobamos que el tiempo de almacenamiento afecta negativamente a la efectividad biológica de las semillas, ya que reduce el porcentaje de germinación de las semillas y el de supervivencia de las plantas. Asimismo, detectamos diferencias interespecíficas en el peso, porcentaje de germinación y tiempo de floración. Los resultados de este trabajo indican que el tiempo de almacenamiento de las semillas en herbarios afecta negativamente a la efectividad biológica de *Lysimachia arvensis* y *L. loeflingii*, por lo que, si queremos mantener la viabilidad de estas semillas, hay que tener en cuenta que conforme aumenta el tiempo de almacenamiento se reduce su viabilidad. Estos resultados tienen diferentes aplicaciones en el campo de la conservación de la biodiversidad, ya que el almacenamiento de semillas en bancos de semillas, por ejemplo, es una herramienta muy útil a la hora de mantener la diversidad genética y conservar especies de plantas amenazadas. Por tanto, es clave conocer cómo afecta el tiempo de almacenamiento a las semillas de cada especie para que estos bancos sean útiles.

## INTRODUCCIÓN

Actualmente una gran cantidad de las especies del planeta se encuentran amenazadas por causas antropogénicas, a este fenómeno se le denomina la sexta extinción masiva (Ceballos *et al.*, 2010). La pérdida de biodiversidad es un problema para la salud planetaria y humana ya que, por ejemplo, la pérdida de especies puede producir la pérdida de eficacia de los ecosistemas a la hora de producir biomasa o capturar recursos biológicos esenciales (Cardinale *et al.*, 2012). Muchas especies en la actualidad se están viendo afectadas por la destrucción del hábitat, el cambio climático o por enfermedades, lo que está provocando una disminución de su diversidad genética y esto puede provocar que las especies sean susceptibles a diversos cambios ambientales y puedan hasta

desaparecer. Además, numerosos estudios han demostrado que la pérdida de diversidad genética y la depresión endogámica aumentan el riesgo de extinción de las especies (Frankham, 2005, O'Grady *et al.*, 2006, Coates *et al.*, 2015). Por tanto, el mantenimiento de la variabilidad genética es esencial para la supervivencia de las poblaciones y de las especies (Frankel & Soulé, 1981). Una medida eficaz para conservar la diversidad genética es la conservación *ex situ* de especies de plantas, que consiste en el almacenamiento de semillas en bancos de semillas (Schoen & Brown, 2001). Estos bancos de semillas contribuyen a mantener la diversidad genética de estas especies, por ejemplo, manteniendo individuos de poblaciones desaparecidas (Bonner, 1990).

El almacenamiento de semillas con fines científicos es una herramienta fundamental para la investigación de diferentes especies de plantas y también para la conservación *ex situ* de las mismas. Una causa importante por la que se puede ver reducida la viabilidad de las semillas, es por la acumulación de daños genéticos (Shvachko *et al.*, 2020). Por este motivo, es importante mantener la viabilidad de las semillas y poder así asegurar la conservación de especies amenazadas. Existen muchos otros factores que pueden afectar a la viabilidad de las semillas como por ejemplo la temperatura, la humedad o el tiempo durante el cual han sido almacenadas (Pradhan & Badola 2012). No obstante, estos efectos no afectan por igual a las semillas de todas las plantas, por lo que es importante estudiar los efectos en diferentes especies. Un ejemplo de esto son las semillas de cebolla que son menos viables que las de otros vegetales, por lo que en lugares en los que estas semillas no se almacenan correctamente, estas semillas son muy demandadas (Thirusendura Selvi & Saraswathy, 2018). Por otra parte, tenemos el caso contrario, como es el ejemplo de las semillas de *Nelumbo nucifera*, que tienen una gran longevidad, con la semilla germinada más antigua que se ha registrado, con 1300 años de antigüedad (Pal & Dey 2015).

En este marco, planteamos la relevancia de conservar semillas de especies silvestres con adaptación a distintas condiciones ambientales, usando dos especies de *Lysimachia* emparentadas, pero con adaptaciones ambientales *a priori* distintas (Arista *et al.* 2013). *Lysimachia arvensis* (L.) Manns & Anderb y *Lysimachia loeflingii* F.J. Jiménez-López & M. Talavera son dos especies emparentadas de plantas herbáceas anuales de la familia Primulaceae. *Lysimachia arvensis*, con flores naranjas, tiene una distribución cosmopolita, ocupando preferentemente zonas atlánticas húmedas (*Figura 1A,B*), mientras que *L. loeflingii*, con flores azules, ocurre en zonas de clima mediterráneo más

seco (Figura 1C,D) (Ortiz *et al.*, 2015), aunque existe múltiples áreas donde viven en simpatria (Arista *et al.*, 2013, Jimenez-Lopez *et al.*, 2023).

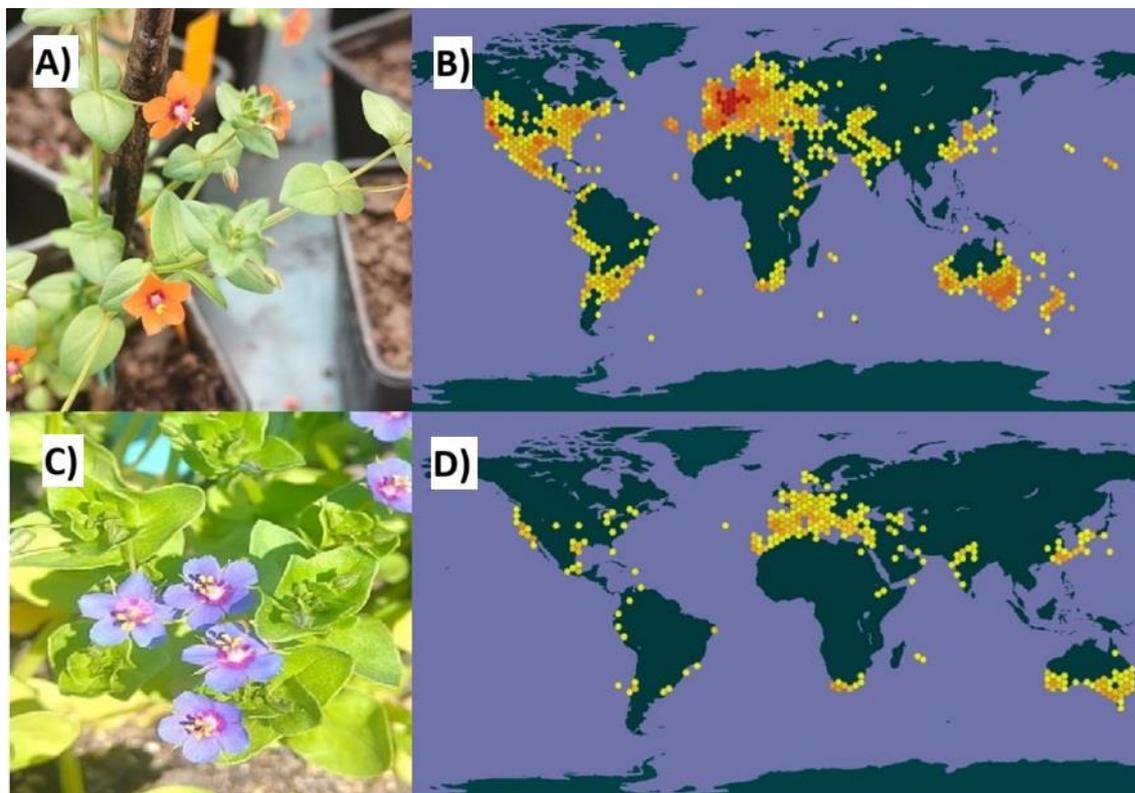


Figura 1: (A) Flores de *Lysimachia arvensis*; (B) Distribución de *L. arvensis* (GBIF); (C) Flores de *Lysimachia loeflingii*; (D) distribución de *L. loeflingii* (GBIF)(Datos de distribución sacados de Global Biodiversity Information Facility (GBIF)(s.f.))

Ambas especies muestran diferencias en la germinación, en la supervivencia de las plantas y en la producción de flores dependiendo de los factores abióticos (Arista *et al.*, 2013). La especie de flores naranjas, *Lysimachia arvensis*, muestra una mayor eficacia biológica o *fitness*, (la capacidad de un individuo de dejar descendencia a la siguiente generación (Burns, 1992)), en sitios húmedos, mientras que la especie de flores azules, *Lysimachia loeflingii*, es más eficaz en ambientes xéricos de clima mediterráneo (Ortiz *et al.*, 2015). Esta aparente adaptación ambiental puede verse reflejada en propiedades de las semillas, como la velocidad de germinación (Jimenez-López *et al.*, 2020), o la capacidad de persistencia en el suelo (Jiang *et al.*, 2021)

Dentro de este marco conceptual, y aprovechando la potencialidad de estas especies, la hipótesis principal del trabajo es que el tiempo de almacenamiento afecta negativamente al *fitness* de las semillas, y de forma diferente en función a las condiciones ambientales de las poblaciones naturales en las que se formaron las semillas. Para ello planteamos que

el objetivo de este trabajo es evaluar cómo afecta el tiempo de almacenamiento de las semillas de *Lysimachia arvensis* y *L. loeflingii* en diferentes medidas de *fitness* (éxito de germinación, supervivencia y fenología floral de las plantas), analizando también si existen diferencias en las respuestas entre especies.

## MATERIALES Y METODOS

### 2.1. Especies de estudio

*Lysimachia arvensis* y *Lysimachia loeflingii* son plantas herbáceas anuales que viven en simpatria en los climas mediterráneos del planeta (*Figura 1*). Ambas especies son hermafroditas, tetraploides, autocompatibles, y presentan movimientos násticos, con pétalos abriéndose por el día y cerrándose por la noche (Arista *et al.*, 2013). Cuando estas especies se encuentran en simpatria se ve una preferencia de los polinizadores por *Lysimachia loeflingii* (Jiménez-López *et al.*, 2023). *L. arvensis* tiene las flores de color naranja mientras que *L. loeflingii* tiene las flores de color azul. Antes se consideraba una única especie siendo el color de las flores un polimorfismo en el que dominaba el color naranja sobre el azul (Ortiz *et al.*, 2015). Aunque la similitud morfológica entre ambas especies es altísima, un análisis filogenético reciente indicó que estas especies divergieron hace unos 2,5 millones de años (Jiménez-López *et al.*, 2022), deben ser consideradas dos especies distintas con el color de las flores como principal rasgo distintivo (Jiménez-López *et al.*, 2022).

### 2.2 Diseño experimental

Para la realización de este experimento se cultivaron semillas de las dos especies almacenadas en herbarios desde el año 2009 hasta el 2017 recolectadas en 48 poblaciones tratando de recoger la mayor variabilidad posible dentro de la distribución de cada especie (*Figura 2*). Se utilizaron semillas recolectadas en Chile (Ensenada y Constitución), Chipre, Francia (Córcega), Italia (2 poblaciones en Cerdeña), Marruecos (Bni Said, M'Dic y Tánger), Portugal (Madeira), España (Navarra, Asturias, Galicia, Badajoz, Valencia, Islas Canarias, Tarragona, Sevilla, Huelva, Girona, Cádiz, Alicante, Cáceres, Córdoba y Girona), Suiza (Vevey y Neuchâtel) y Estados Unidos (California) (*Figura 2 Tabla 1*). El tiempo de almacenamiento de las semillas varió de los 6 a 15 años (*Tabla 1*), siendo más numerosas las recolecciones más recientes (< 10 años) de estas (*Figura 3*).

Tabla 1: Ubicación, coordenadas y tiempo de almacenamiento de las 46 poblaciones de *L. arvensis* y *L. loeflingii* utilizadas en este estudio.

Especie	Localidad	Latitud	Longitud	Tiempo de almacenamiento (Años)
<i>L. arvensis</i>	Chile. Ensenada	-41,21652	-72,55433	6
<i>L. arvensis</i>	Chile. Constitucion	-35,33386	-72,43513	6
<i>L. arvensis</i>	Corsica. Solenzara.	41,85543	9,36213	8
<i>L. arvensis</i>	Sardinia. Chia. Spiaggia di Monte Cogoni	38,89491	8,87775	14
<i>L. arvensis</i>	Sardinia. Isola di Santo Antioco, 275/09	39,0832	8,35692	13
<i>L. arvensis</i>	Bni Said. Between Oued Azla-Oued Lau	35,493333	-5,144167	10
<i>L. arvensis</i>	Madeira. Porto Moniz	33,86771	-17,16598	11
<i>L. arvensis</i>	Navarra	42,91931	-1,78202	6
<i>L. arvensis</i>	Galicia. Islas Cies. Illa de Monteagudo	42,23235	-8,90454	14
<i>L. arvensis</i>	Badajoz. Calera de León - Fregenal de la Sierra	38,085944	-6,406056	7
<i>L. arvensis</i>	Valencia	39,40609	-0,34087	6
<i>L. arvensis</i>	Canary Islands. Tenerife. Anaga. montes de Anaga. Albergue	28,550417	-16,201278	8
<i>L. arvensis</i>	Tarragona. San jordi	40,92917	0,81686	6
<i>L. arvensis</i>	Sevilla. Parque Alamillo	37,41324	-5,99545	8
<i>L. arvensis</i>	Huelva. Hinojos. Pine forests	37,28735	-6,4097	7
<i>L. arvensis</i>	Girona	42,00166	2,84617	6
<i>L. arvensis</i>	Sevilla. Dos hermanas. ETSIA	37,35246	-5,93975	7
<i>L. arvensis</i>	Vevey	46,4677	6,85103	8
<i>L. arvensis</i>	Neuchâtel	46,99567	6,9077	7
<i>L. arvensis</i>	California. Santa Clara. Lexington avenue	37,34764	-121,94495	7
<i>L. arvensis</i>	California. San Jose. Fortini	37,22542	-121,80865	7

<i>L. arvensis</i>	Tarragona. Montroig del camp	41,08729	0,93745	7
<i>L. loeflingii</i>	Chile. Constitucion	-35,33386	-72,43513	6
<i>L. loeflingii</i>	Chipre	35,31836	33,46511	6
<i>L. loeflingii</i>	Sardinia. Chia. Spiaggia di Monte Cogoni	38,89491	8,87775	14
<i>L. loeflingii</i>	Sardinia. Isola di Santo Antioco, 275/09	39,0832	8,35692	13
<i>L. loeflingii</i>	M'Dic. Cabo Negro	35,672222	-5,3075	8
<i>L. loeflingii</i>	Bni Said. Between Oued Azla-Oued Lau	35,493333	-5,144167	10
<i>L. loeflingii</i>	Tanger. Cap Spartel	35,765556	-5,934167	10
<i>L. loeflingii</i>	Cádiz. Zahara de los atunes	36,10748	-5,8264	7
<i>L. loeflingii</i>	Sevilla. El Pedroso	37,83796	-5,77216	11
<i>L. loeflingii</i>	Canary Islands. Gran canaria. Almatriche Bajo	28,0667	-15,4667	8
<i>L. loeflingii</i>	Alicante. Denia	38,84228	0,10569	8
<i>L. loeflingii</i>	Cáceres. Losar de la Vesa. Garganta de Cuartos	40,113889	-5,582222	7
<i>L. loeflingii</i>	Cordoba. Carcabuey. El calvario	37,434677	-4,272241	13
<i>L. loeflingii</i>	Alicante. Albaida	38,8106	-0,5	8
<i>L. loeflingii</i>	Valencia	39,40609	-0,34087	6
<i>L. loeflingii</i>	Canary Islands. Tenerife. Anaga. montes de Anaga. Albergue	28,550417	-16,201278	8
<i>L. loeflingii</i>	Tarragona. San jordi	40,92917	0,81686	6
<i>L. loeflingii</i>	Sevilla. Parque Alamillo	37,41324	-5,99545	8
<i>L. loeflingii</i>	Huelva. Hinojos. Pine forests	37,28735	-6,4097	12
<i>L. loeflingii</i>	Girona	42,00166	2,84617	6
<i>L. loeflingii</i>	Sevilla. Dos hermanas. ETSIA	37,35246	-5,93975	7
<i>L. loeflingii</i>	Sevilla. Constantina	37,8804	-5,62605	8
<i>L. loeflingii</i>	Canary Islands. Gran canaria. Barranco La mina. Utiaca	28,0178	15,5536	8
<i>L. loeflingii</i>	Cádiz. Zahara de la Sierra	36,83763	-5,39548	7
<i>L. loeflingii</i>	Tarragona. Montroig del camp	41,08729	0,93745	7

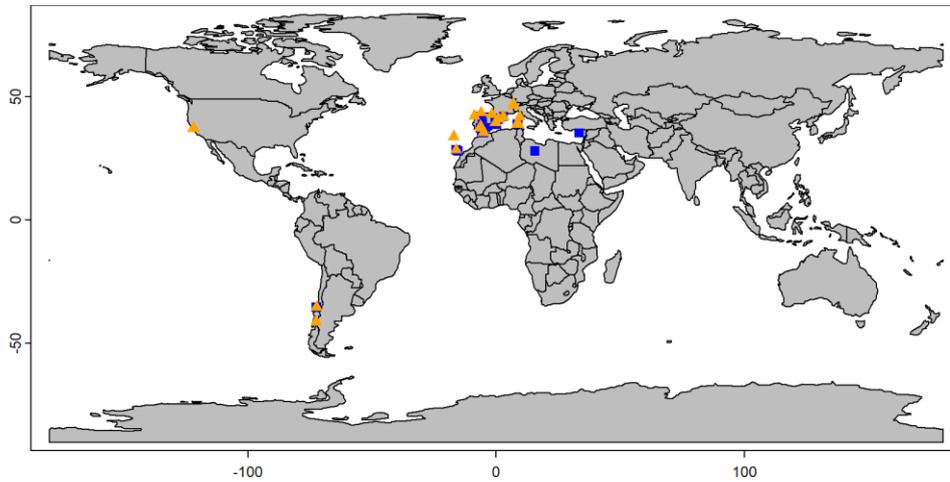


Figura 2: Localización de las poblaciones de origen de las distintas semillas. En naranja *Lysimachia arvensis* y en azul *Lysimachia loeflingii*.

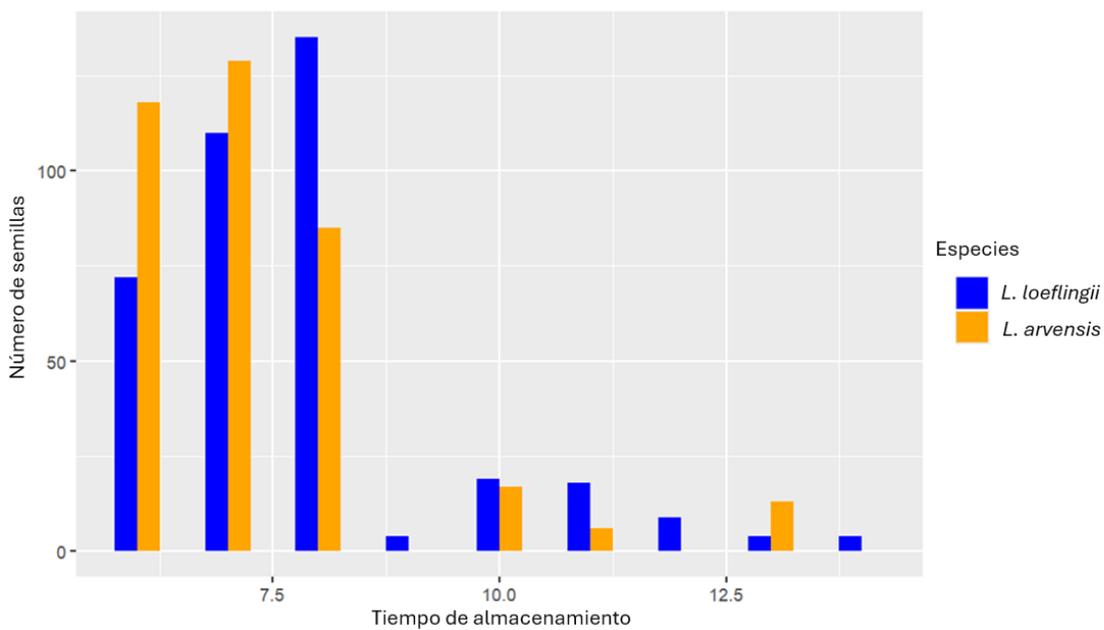


Figura 3: Histograma de número de semillas de cada especie según el tiempo de almacenamiento (Años)

Primero, para evaluar el éxito de germinación, se rehidrataron las semillas en placas Petri con papel de filtro y riego manual con agua destilada. Estas placas se apilaron en cámaras de cultivo con 14 horas de luz a 22°C y 10 horas de oscuridad a 16°C. Se realizó un seguimiento diario de la germinación, rotando aleatoriamente la posición de las placas dentro de la cámara de germinación. Se consideró semilla germinada aquella que

consiguió liberar ambos cotiledones de la testa. Las plántulas germinadas se cultivaron en el invernadero del campus de Móstoles de la Universidad Rey Juan Carlos.

Segundo, para evaluar la supervivencia y la fenología de floración, las plántulas cultivadas en el invernadero se plantaron en tiestos de 0,5 l con tierra vegetal bajo condiciones ambientales controladas durante cuatro meses (desde enero a abril de 2024). Las plantas tuvieron suplemento de luz artificial 12 horas (7 am a 7 pm), riego por aspersión de 10 minutos a las 7:45 y 5 minutos a las 19:45 hasta el 12 de marzo de 2024 y de 3 minutos a las 19:45 a partir de esta fecha. La temperatura del invernadero oscilaba entre 14 y 25 ° C. A todos los individuos se les fue haciendo un seguimiento periódico para evaluar la supervivencia de la plántula y también se anotó la fecha de floración de estos individuos si llegaron a florecer. Para la supervivencia se miró el porcentaje de supervivencia, que se obtuvo a partir de las plantas que sobrevivieron, es decir que llegaron a estado adulto, del total de las que germinaron de cada población. Y también se apuntó la tasa de supervivencia, que se obtuvo dando valores de 1 si habían llegado a la adultez o 0 si no lo habían hecho, para hacer el modelo teniendo en cuenta a cada individuo por separado.

Para controlar el efecto del tamaño de la planta en la supervivencia y floración, se consideró la biomasa de estas plantas al final del experimento. Se midió el peso fresco y el peso seco tras dejarlas 48 horas en una estufa a 60 ° C.

### **2.3. Análisis estadísticos**

Todos los análisis estadísticos y figuras se realizaron en RStudio (versión 2024.04.0). Una vez recopilados todos los datos se definieron siete variables dependientes (respuestas) relacionadas con la eficacia biológica (porcentaje de germinación, tiempo de germinación, porcentaje y tasa de supervivencia de las plántulas, biomasa y tiempo de floración, desde la germinación y desde que la planta era adulta), y dos variables independientes (predictoras), que fueron tiempo de almacenamiento y color de la flor (especie).

Se realizaron modelos lineales mixtos para evaluar los efectos del tiempo de almacenamiento y la especie (efectos fijos), de las variables predictoras sobre el tiempo de germinación, la tasa de supervivencia, la biomasa y los tiempos de floración (variables de distribución normal), y modelos lineales mixtos generalizados para analizar los mismos efectos fijos en el porcentaje de germinación y el porcentaje de supervivencia

(respuestas con distribución binomial). La población de origen y la planta madre se incluyeron como efectos aleatorios sobre el intercepto en todos los modelos.

La variable predictora, tiempo de almacenamiento, fue estandarizada con la función “scale” en todos los modelos. Se estimó el nivel de la significación de los p-valores de los modelos mixtos utilizando el paquete “lmerTest” (Kuznetsova *et al.*, 2017), y se usó el paquete “ggplot2” para visualizar los datos (Wickham, 2016). Por último, para determinar la calidad de los análisis, se comprobaron los residuos de los modelos utilizando el paquete “DHARMa” (Hartig, 2017).

## RESULTADOS

### 3.1 Porcentaje de germinación

El porcentaje de germinación de las semillas se vio significativamente afectado por el tiempo de almacenamiento (*Tabla 2*), ya que vemos que cuanto mayor es el tiempo de almacenamiento menor es el porcentaje de germinación (*Figura 4*) y por la especie, teniendo *Lysimachia arvensis* un porcentaje de germinación menor que *L. loeflingii* (*Figura 4*). No se observaron diferencias en el porcentaje de germinación dependiendo de la interacción de ambas variables (*Tabla 2*).

*Tabla 2: Resultados de los efectos fijos del modelo lineal generalizado del porcentaje de germinación según el color y el tiempo ( años) de almacenamiento.*

	Estimador	Std. Error	Z value	p-valor
<b>GERMINACIÓN</b>				
<b>(%)</b>				
<b>(Intercepto)</b>	-1,301	0,244	-5,331	0,000 ***
<b>Tiempo</b>	-1,144	0,044	-26,097	0.000 ***
<b>Color (Orange)</b>	-0,224	0,0464	-4,825	0.000***
<b>Tiempo:Color (Orange)</b>	-0,015	0,058	-0,264	0,792

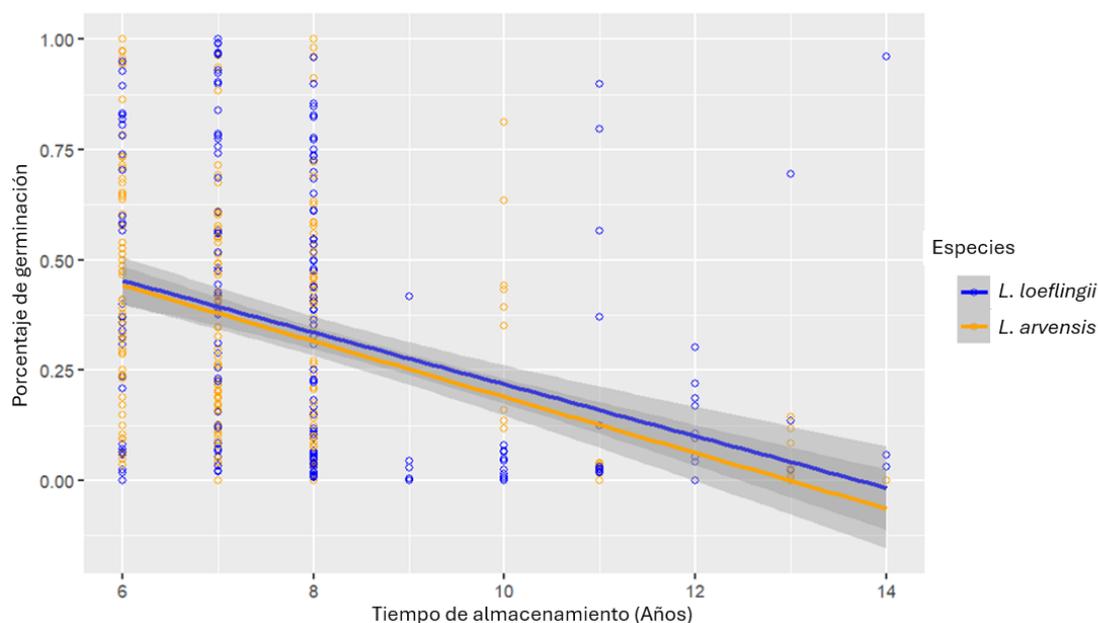


Figura 4: Porcentaje de germinación de cada especie en función del tiempo (años) de almacenamiento

### 3.2 Tiempo de germinación

El tiempo de germinación difirió significativamente entre especies, puesto que *Lysimachia arvensis* tardó menos tiempo en germinar que *L. loeflingii*. La interacción entre la especie y el tiempo de almacenamiento también fue significativa (Tabla 3), e indicó que el efecto del tiempo de almacenamiento afectó más a *Lysimachia arvensis*, ya que aumentó más el tiempo de germinación que en el caso de *L. loeflingii* (Tabla 3, Figura 5).

Tabla 3: Resultados de los efectos fijos del modelo lineal del tiempo de germinación según el color y el tiempo (años) de almacenamiento.

TIEMPO DE GERMINACIÓN	Estimador	Std. Error	df	T value	p-valor
(Intercepto)	15,343	0,706	41,196	21,744	0,000***
Tiempo	0,357	0,380	294,971	0,939	0,348
Color (Orange)	-1,384	0,487	674,781	-2,845	0,00458**
Tiempo:Color (Orange)	1,886	0,475	469,576	3,970	0,000***

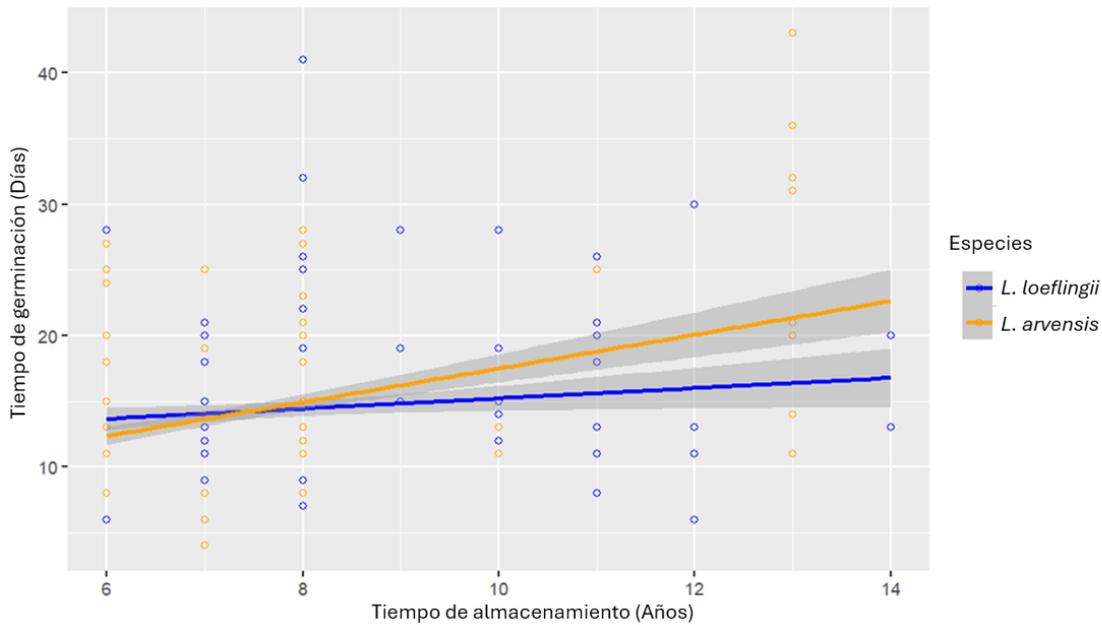


Figura 5: Gráfica del tiempo de germinación de las semillas de cada especie en función de los años de almacenamiento

### 3.3 Porcentaje de supervivencia

El porcentaje de plantas supervivientes se vio afectado por el tiempo que llevasen las semillas de esa población almacenadas (Tabla 4), siendo un porcentaje menor según aumentó el tiempo de almacenamiento y también por la interacción entre el tiempo almacenadas y la especie, ya que el tiempo de almacenamiento afectaba más a *Lysimachia arvensis* que a *L. loeflingii*. Cuanto mayor fue el tiempo de almacenamiento, mayor fue porcentaje de supervivencia en las plantas con flores de color naranja, mientras que las plántulas de *L. loeflingii* sobrevivieron un porcentaje similar para todo el tiempo de almacenamiento estudiado (Figura 6). Pero la diferencia del porcentaje según el color de la planta no fue significativa (Tabla 4).

Tabla 4: Resultados de los efectos fijos del modelo lineal generalizado del porcentaje de supervivencia según el color y el tiempo (años) de almacenamiento.

Supervivencia (%)	Estimador	Std. Error	Z value	p-valor
(Intercepto)	1,089	0,235	4,641	0,000***
Tiempo	-0,821	0,084	-9,775	0,000***
Color (Orange)	-0,107	0,094	-1,135	0,256
Tiempo:Color (Orange)	0,789	0,137	5,756	0,000***

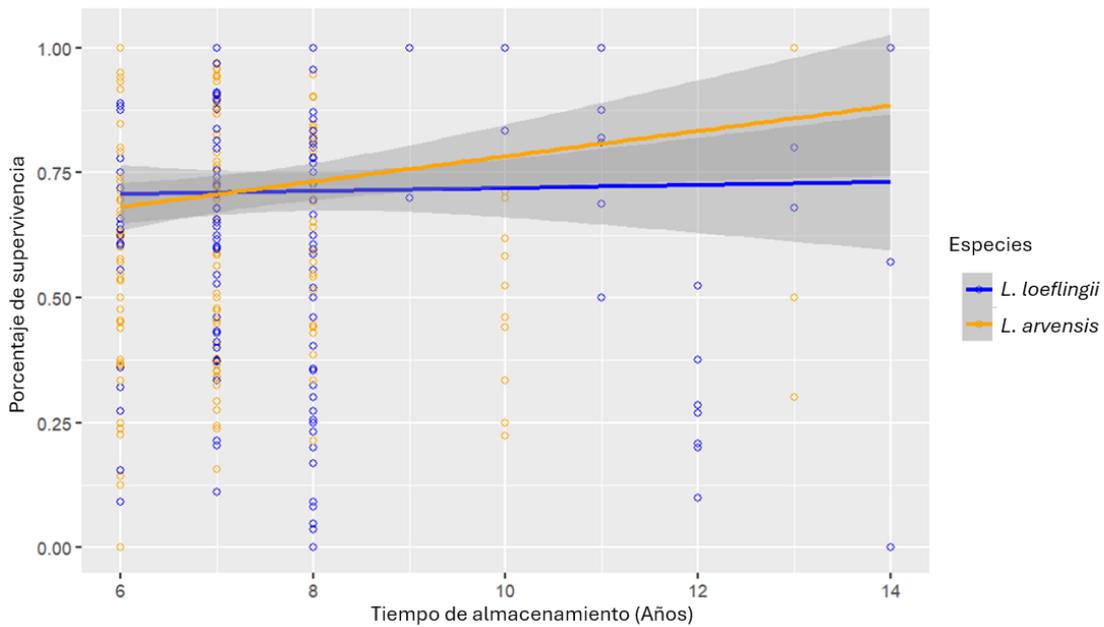


Figura 6: Gráfica del porcentaje de supervivencia de las plántulas de cada especie en función del tiempo almacenamiento de las semillas

### 3.4 Tasa de supervivencia

Las plántulas tuvieron una alta tasa de supervivencia para ambas especies, sin verse afectados por el tiempo de almacenamiento (Figura 7). Las tasas de supervivencia no se vieron afectadas por la especie, el tiempo de almacenamiento de las semillas o la interacción de ambas. Por lo que podemos decir que la tasa de supervivencia de las plántulas no se ve afectada por estas variables cuando no se tienen en cuenta las poblaciones de las que vienen (Tabla 5).

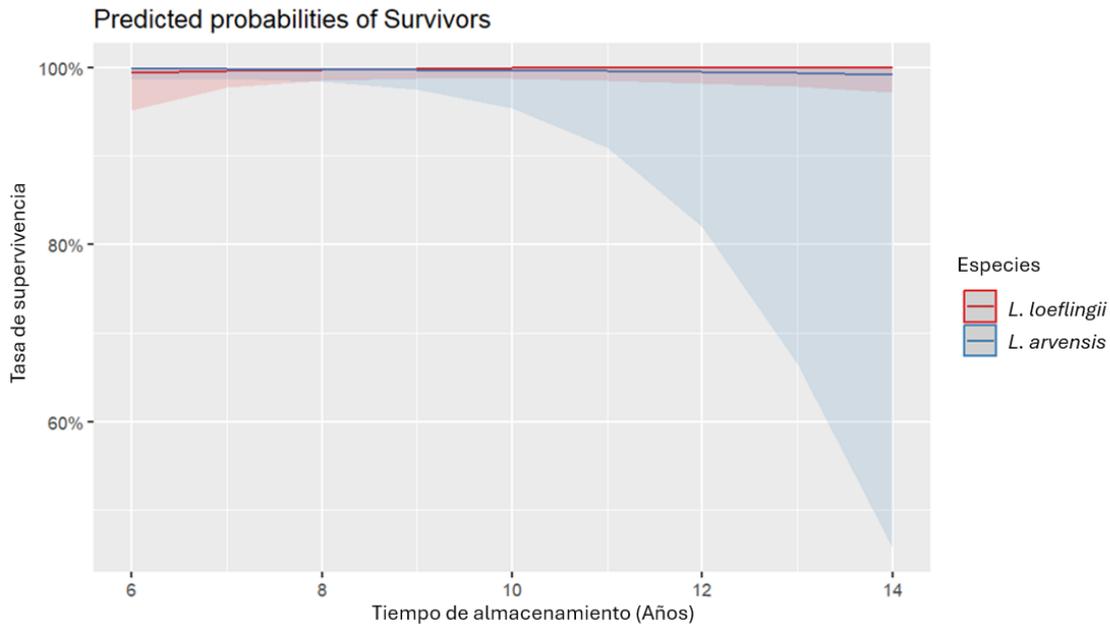


Figura 7: Gráfica de la tasa de supervivencia de todos los individuos en función de los años de almacenamiento de las semillas

Tabla 5: Resultados de los efectos fijos del modelo lineal de la tasa de supervivencia según el color y el tiempo (años) de almacenamiento.

SUPERVIVENCIA	Estimador	Std. Error	Z value	p-valor
<b>(Intercepto)</b>	5,996	1,532	3,915	0,000***
<b>Tiempo</b>	0,805	0,649	1,240	0,215
<b>Color (Orange)</b>	0,261	0,752	0,547	0,729
<b>Tiempo:Color (Orange)</b>	-1,159	0,872	-1,330	0,184

### 3.5 Biomasa

El peso seco de las plantas no difirió significativamente con el tiempo de almacenamiento de las semillas, pero la diferencia sí fue significativa según la especie (Tabla 6). Las plantas de *L. arvensis* tuvieron mayor peso que las plantas de *L. loeflingii*. También la interacción entre el tiempo de almacenamiento y la especie fue significativa para la diferencia del peso seco de las plantas, de manera que las plantas de color naranja cuanto más tiempo almacenadas llevaran menos pesaban. (Tabla 6; Figura 8).

Tabla 6: Resultados de los efectos fijos del modelo lineal del peso seco según el color y el tiempo (años) de almacenamiento.

BIOMASA (mg)	Estimador	Std. Error	df	T value	p-valor
<b>(Intercepto)</b>	0,205	0,013	33,602	15,255	0,000***
<b>Tiempo</b>	-0,005	0,009	115,816	-0,591	0,556
<b>Color (Orange)</b>	0,076	0,016	106,733	4,795	0,000***
<b>Tiempo:Color (Orange)</b>	-0,036	0,014	103,718	-2,53	0,0126*

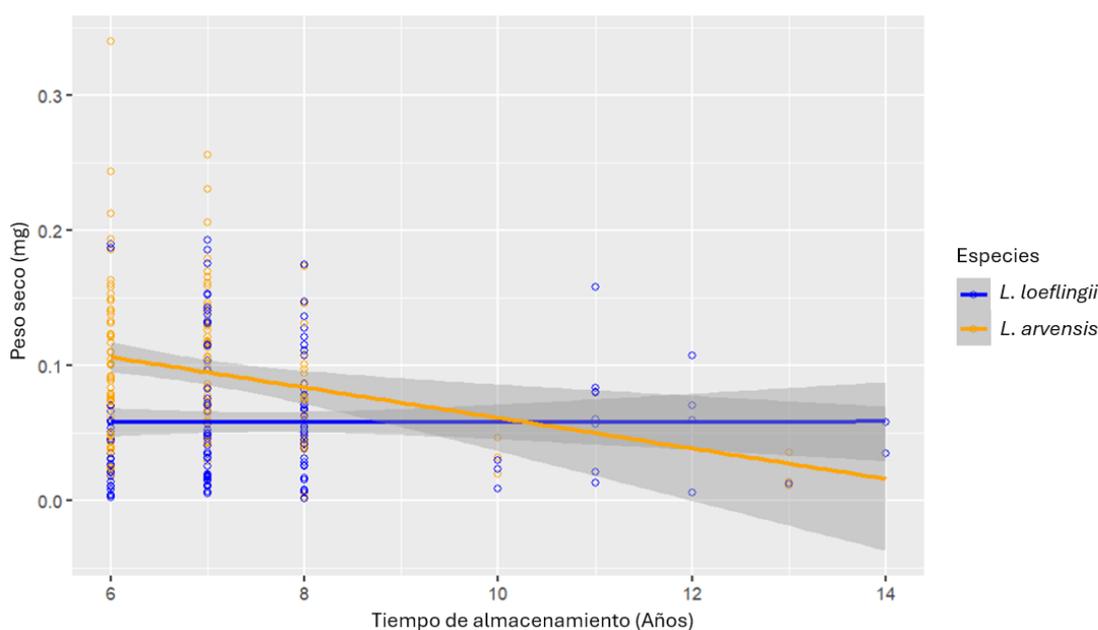


Figura 8: Relación del peso seco (mg) de las plantas en función del tiempo de almacenamiento y la especie

### 3.6 Tiempo de floración

Por último, el tiempo de floración no difirió significativamente en función del tiempo de almacenamiento, ni por la especie y tampoco por la interacción de ambas variables en ninguno de los dos tiempos hasta la floración, siendo el tiempo uno desde que germinó la semilla y el tiempo dos desde que fue trasplantada a maceta (Tabla 7 y 8). El tiempo que han estado las semillas almacenadas, afecta de forma muy similar para el tiempo hasta floración 1 y 2. En *L. arvensis* hay una tendencia a reducir el tiempo hasta floración con el almacenamiento, mientras que en *L. loeflingii* tiende a aumentarse el tiempo hasta

floración con el almacenamiento (*Figuras 9 y 10*), aunque en ningún caso es significativo (*Tablas 7 y 8*).

*Tabla 7: Resultados de los efectos fijos del modelo lineal del tiempo de floración desde que germinó la semilla según el color y el tiempo (años) de almacenamiento.*

TIEMPO DE FLORACIÓN	Estimador	Std. Error	df	T value	p-valor
<b>1</b>					
<b>(Intercepto)</b>	98,368	1,928	38,296	51,012	0,000***
<b>Tiempo</b>	0,061	0,995	28,387	0,062	0,951
<b>Color (Orange)</b>	-0,987	1,238	681,977	-0,797	0,426
<b>Tiempo:Color (Orange)</b>	0,468	1,211	522,529	0,387	0,699

*Tabla 8: Resultados de los efectos fijos del modelo lineal del tiempo de floración desde que es trasplantada a maceta según el color y el tiempo (años) de almacenamiento.*

TIEMPO DE FLORACIÓN	Estimador	Std. Error	df	T value	p-valor
<b>2</b>					
<b>(Intercepto)</b>	95,672	2,028	38,180	47,177	0,000***
<b>Tiempo</b>	-0,049	1,034	330,271	-0,047	0,962
<b>Color (Orange)</b>	-1,214	1,283	683,890	-0,946	0,344
<b>Tiempo:Color (Orange)</b>	1,538	1,258	510,119	1,223	0,222

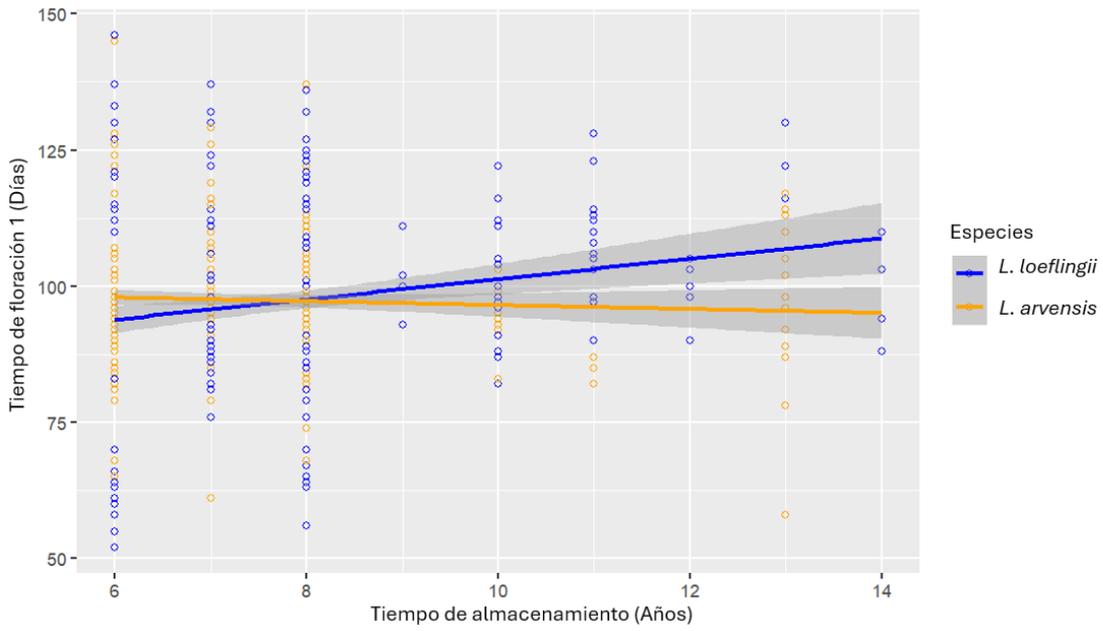


Figura 9: Gráfica del tiempo de floración de las plantas de cada especie desde que germinaron en función de los años de almacenamiento

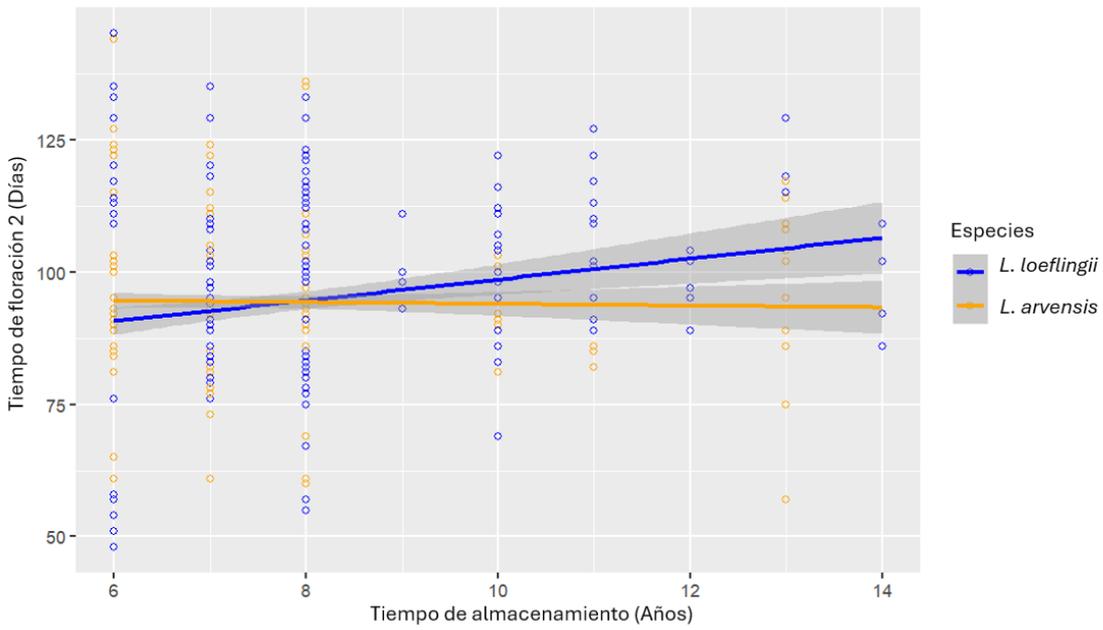


Figura 10: Gráfica del tiempo de floración de las plantas de cada especie desde que son adultas en función de los años de almacenamiento

## DISCUSIÓN

Nuestros resultados indican que el tiempo de almacenamiento redujo el porcentaje de germinación de las semillas y el porcentaje de supervivencia de las plántulas, pero no detectamos efectos significativos en las demás variables medidas, que son el tiempo de germinación, la tasa de supervivencia, la biomasa y, por último, los dos tiempos de floración medidos. Además, detectamos diferencias en algunas respuestas en función de la especie de *Lysimachia*, ya que *L. arvensis* tiene un menor porcentaje de germinación, un menor tiempo de germinación y una mayor biomasa que *L. loeflingii*. Atendiendo a nuestra hipótesis de partida los resultados obtenidos indican que podemos aceptarla, ya que el tiempo de almacenamiento afecta al fitness de las semillas, reduciendo su porcentaje de germinación y de supervivencia.

El porcentaje de germinación difirió entre especies, esto puede deberse a las condiciones ambientales donde las semillas se formaron. Dado que las semillas acumulan sustancias de reserva que facilitan la germinación, es esperable que en ambientes más estresantes como el mediterráneo las semillas con menos recursos tengan más dificultades para germinar. Sin embargo, nuestros resultados indican que las semillas de *L. loeflingii*, tienden a germinar en mayor número que las de *L. arvensis*. Esto apoya los resultados obtenidos en estudios previos de estas especies de *Lysimachia* (Jiménez-López *et al.*, 2020). Además, ambas especies tienden a reducir su éxito de germinación con el tiempo de almacenamiento, especialmente las semillas de *L. arvensis* (Figura 4). Esto es esperable pues la viabilidad de las semillas cae drásticamente con el tiempo de almacenamiento. Esta pérdida en la viabilidad de las semillas a menudo está relacionada con la oxidación de macromoléculas de estas, como ácidos nucleicos, proteínas y lípidos (Sano *et al.*, 2016). En estudios con *Periploca angustifolia* (Abdellaoui *et al.*, 2013) o *Tanacetum cinerariifolium* (Ilinkin *et al.*, 2020) también se encontró una pérdida de capacidad de germinación con el aumento del tiempo de almacenamiento.

Respecto al tiempo necesario para la germinación de las semillas, las de *L. arvensis* tardaron menos en germinar que las de *L. loeflingii*. En un estudio anterior se observó que *Lysimachia loeflingii* germinaba antes que *Lysimachia arvensis*, pero en este estudio, se plantaron las plantas bajo condiciones ambientales de un clima mediterráneo (Jiménez-López *et al.*, 2020). Por lo que puede ser que, en unas condiciones más húmedas, como en las que se encontraban en el invernadero, se favorezca la germinación de *L. arvensis*,

ya que es una especie menos ligada a estos climas mediterráneos. El tiempo de germinación también se diferencia por la interacción del tiempo de almacenamiento y el color, es decir que, dependiendo del color, el efecto del tiempo de almacenamiento sobre el tiempo de germinación difiere. Ya que las semillas de *Lysimachia arvensis* cuanto más tiempo estuvieron almacenadas más tardaron en germinar (*Tabla 3*).

En cuanto al porcentaje de supervivencia de las plántulas, se observó que cuanto más tiempo llevasen almacenadas las semillas, menor fue el porcentaje de supervivientes. Esta reducción en la supervivencia de las plántulas puede deberse a la pérdida de viabilidad de las semillas según aumenta el tiempo de almacenamiento (Pradhan *et al.*, 2012). Al igual que en otros estudios, no detectamos una diferencia significativa en la supervivencia de las plantas en las mismas condiciones dependiendo de la especie de *Lysimachia* (Arista *et al.*, 2013). Sin embargo, sí que se observó que el tiempo de almacenamiento afectaba más a *L. arvensis* que a *L. loeflingii*, haciendo que a más tiempo almacenadas mayor porcentaje de supervivencia en las plantas con flores de color naranja. En un estudio anterior en condiciones de clima mediterráneo se apreció una mayor supervivencia en *L. loeflingii*, ya que se encuentra mejor adaptada a este clima (Jiménez-López *et al.*, 2020). Por tanto, es probable que en las condiciones más húmedas en invernadero, unido al tiempo de almacenamiento, que como ya hemos visto reduce el porcentaje de supervivencia de las plántulas, haga que esta especie se vea más afectada por el tiempo de almacenamiento, reduciendo aún más el porcentaje de supervivencia según aumenta el tiempo de almacenamiento con relación a *L. arvensis*.

La diferencia en el peso de las plantas varió dependiendo de la especie. La especie de flores de color naranja, *L. arvensis*, pesa significativamente más que *L. loeflingii*. Un estudio anterior demuestra que en condiciones secas las plantas de flores azules pesan más que las de flores naranjas (Arista *et al.*, 2013). Dado que en este estudio las plantas experimentaron las mismas condiciones y eran condiciones más húmedas que secas, es posible que las flores de color naranja, estén más adaptadas a estas condiciones climáticas y crezcan más. El peso también se vio afectado por la interacción entre la especie y el tiempo de almacenamiento, donde se vio que dependiendo de la especie el efecto del tiempo de almacenamiento era distinto, ya que las plantas de color naranja cuanto más tiempo almacenadas llevaran menos pesaban. Esto puede deberse a que las semillas pierden viabilidad según aumenta el tiempo de almacenamiento (Lozano-Isla *et al.*, 2018), haciendo que las semillas tengan menos nutrientes para crecer. Aunque esto parece

no afectar mucho, ya que el tiempo de almacenamiento no afecta a la biomasa (*Tabla 6*), quizá afecte en mayor medida a la especie *L. arvensis*.

Por último, el tiempo de floración de las plantas, desde que germinaron, o desde que se trasplantaron no se relacionó significativamente con el tiempo de almacenamiento, la especie o la interacción de ambas variables. Esto contrasta con estudios anteriores que sí detectaron una diferencia en el tiempo de floración, obteniendo que las plantas de flores azules florecían antes que las de flores naranjas (Arista *et al.*, 2013). Pero al igual que ocurría antes, en este estudio realizaron los experimentos en un clima mediterráneo, por lo que la diferencia en estos resultados puede deberse a que la especie *L. loeflingii* está más adaptada a estos ambientes.

Todos estos resultados deben analizarse teniendo en cuenta que el cultivo se ha realizado dentro de invernadero y la ventana temporal de almacenamiento disponible para las semillas. En consecuencia, algunas posibles mejoras para fortalecer el estudio, sería aumentar el tamaño muestral, tomando semillas de un rango mayor de tiempo de almacenamiento, incluyendo semillas más recientes de ambas especies (< 6 años) o más antiguas (> 15 años), así como también probar nuevos diseños experimentales sometiendo las plantas a dos climas contrastantes, un clima mediterráneo y un clima más húmedo, para ver si la diferencia en algunas variables medidas en estudios anteriores se debe a esto. Finalmente, una posible línea de investigación futura sería estudiar si almacenando las semillas en distintas condiciones de humedad o temperatura, la eficacia biológica de estas se ve menos afectada por el tiempo de almacenamiento. Es importante encontrar la mejor manera de almacenar las semillas para afectar lo menos posible a su viabilidad, ya que esto puede ser clave para la conservación de estas especies.

## CONCLUSIONES

En este trabajo constatamos cómo el tiempo de almacenamiento afecta negativamente a el porcentaje de germinación y supervivencia de las especies estudiadas, *Lysimachia arvensis* y *Lysimachia loeflingii*. Se observó que, entre especies, hay una diferencia en peso seco de la planta, porcentaje de germinación y tiempo de floración. Estos resultados apoyan nuestra hipótesis principal de que el tiempo de almacenamiento de las semillas afecta al *fitness* de estas especies. Estos resultados son de utilidad ya que saber que efectos disminuyen la viabilidad de las semillas puede ayudarnos a conservar mejor estas

especies, y mantener así la biodiversidad del planeta. Considerando que quizás el resultado pueda mejorarse con un aumento del tamaño muestral, así como también probar nuevos diseños experimentales sometiendo las plantas a dos climas contrastantes.

Los Objetivos de Desarrollo Sostenible (ODS), son objetivos aprobados por la comunidad internacional, con la meta de acabar con la pobreza, proteger el planeta y mejorar las vidas y perspectivas de las personas, con el fin de alcanzar el desarrollo sostenible de la humanidad (Gil, 2018). Por lo que es importante cumplirlos o hacer todo lo posible por intentarlo. Este estudio tiene una clara relación con dos de ellos como son “Acción por el clima” y “Vida de ecosistemas terrestres”, ya que busca conservar la biodiversidad del planeta manteniendo especies como *Lysimachia arvensis* o *Lysimachia loeflingii*.

## AGRADECIMIENTOS

Agradecemos al herbario de la Universidad de Sevilla por conservar y ceder las semillas utilizadas en este estudio y al personal de CULTIVE (José Margalet, Carlos Díaz y Carlos Ingala) por facilitarnos el trabajo en las cámaras de cultivo y en el invernadero de la URJC.

## BIBLIOGRAFÍA

- Abdellaoui, R., Souid, A., Zayoud, D., & Neffati, M. (2013). Effects of natural long storage duration on seed germination characteristics of *Periploca angustifolia* Labill. *African Journal of Biotechnology*, 12(15).
- Arista, M., Talavera, M., Berjano, R., & Ortiz, P. L. (2013). Abiotic factors may explain the geographical distribution of flower colour morphs and the maintenance of colour polymorphism in the scarlet pimpernel. *Journal of Ecology*, 101(6), 1613-1622.
- Bonner, F. T. (1990). Storage of seeds: potential and limitations for germplasm conservation. *Forest Ecology and Management*, 35(1-2), 35-43.
- Burns, T. P. (1992). Adaptedness, evolution and a hierarchical concept of fitness. *Journal of theoretical biology*, 154(2), 219-237.
- Cardinale, B. J., Duffy, J. E., Gonzalez, A., Hooper, D. U., Perrings, C., Venail, P., ... & Naeem, S. (2012). Biodiversity loss and its impact on humanity. *Nature*, 486(7401), 59-67.

- Ceballos, G., García, A., & Ehrlich, P. R. (2010). The sixth extinction crisis: Loss of animal populations and species. *Journal of Cosmology*, 8(1821), 31.
- Coates, D. J., McArthur, S. L., & Byrne, M. (2015). Significant genetic diversity loss following pathogen driven population extinction in the rare endemic *Banksia brownii* (Proteaceae). *Biological Conservation*, 192, 353-360.
- Frankel, O. H., and M. E. Soule. 1981. *Conservation and evolution*. Cambridge University Press, Cambridge, England.
- Frankham, R. (2005). Genetics and extinction. *Biological Conservation*, 126(2), 131-140.
- Gil, C. G. (2018). Objetivos de Desarrollo Sostenible (ODS): una revisión crítica. *Papeles de relaciones ecosociales y cambio global*, (140), 107-118.
- Global Biodiversity Information Facility (GBIF)(s.f.) <https://www.gbif.org/es/>
- Hartig, F., & Hartig, M. F. (2017). Package ‘dharma’. *R package*.
- Ilinkin, V., Yankova-Tsvetkova, E., & Stanilova, M. (2020). Germination and viability of seeds of *Tanacetum cinerariifolium* (Asteraceae). *Comptes rendus de l'Académie bulgare des Sciences*, 73(7).
- Jiang, L., She, C., Tian, C., Tanveer, M., & Wang, L. (2021). Storage Period and Different Abiotic Factors Regulate Seed Germination of Two *Apocynum* Species—Cash Crops in Arid Saline Regions in the Northwestern China. *Frontiers in Plant Science*, 12, 671157.
- Jiménez-López, F. J., Arista, M., Talavera, M., Cerdeira Morellato, L. P., Pannell, J. R., Viruel, J., & Ortiz Ballesteros, P. L. (2023). Multiple pre-and postzygotic components of reproductive isolation between two co-occurring *Lysimachia* species. *New Phytologist*, 238(2), 874-887.
- Jiménez-López, F. J., Ortiz, P. L., Talavera, M., & Arista, M. (2020). Reproductive assurance maintains red-flowered plants of *Lysimachia arvensis* in Mediterranean populations despite inbreeding depression. *Frontiers in Plant Science*, 11, 563110.
- Jiménez-López, F. J., Viruel, J., Arista, M., Ortiz, P. L., & Talavera, M. (2022). Molecular approaches reveal speciation between red-and blue-flowered plants in the Mediterranean *Lysimachia arvensis* and *L. monelli* (Primulaceae). *Botanical Journal of the Linnean Society*, 199(2), 557-577.

- Kuznetsova, A., Brockhoff, P. B., & Christensen, R. H. B. (2017). lmerTest Package: Tests in Linear Mixed Effects Models. *Journal of Statistical Software*, 82(13). <https://doi.org/10.18637/jss.v082.i13>
- Lozano-Isla, F., Campos, M. L., Endres, L., Bezerra-Neto, E., & Pompelli, M. F. (2018). Effects of seed storage time and salt stress on the germination of *Jatropha curcas* L. *Industrial Crops and Products*, 118, 214-224.
- O'Grady, J. J., Brook, B. W., Reed, D. H., Ballou, J. D., Tonkyn, D. W., & Frankham, R. (2006). Realistic levels of inbreeding depression strongly affect extinction risk in wild populations. *Biological conservation*, 133(1), 42-51.
- Ortiz, P. L., Berjano, R., Talavera, M., Rodríguez-Zayas, L., & Arista, M. (2015). Flower colour polymorphism in *Lysimachia arvensis*: how is the red morph maintained in Mediterranean environments? *Perspectives in Plant Ecology, Evolution and Systematics*, 17(2), 142-150.
- Pal, I., & Dey, P. (2015). A review on lotus (*Nelumbo nucifera*) seed. *International Journal of Science and Research*, 4(7), 1659-1665.
- Pradhan, B. K., & Badola, H. K. (2012). Effect of storage conditions and storage periods on seed germination in eleven populations of *Swertia chirayita*: a critically endangered medicinal herb in Himalaya. *The Scientific World Journal*, 2012.
- Sano, N., Rajjou, L., North, H. M., Debeaujon, I., Marion-Poll, A., & Seo, M. (2016). Staying alive: molecular aspects of seed longevity. *Plant and Cell Physiology*, 57(4), 660-674.
- Schoen, D. J., & Brown, A. H. (2001). The conservation of wild plant species in seed banks: attention to both taxonomic coverage and population biology will improve the role of seed banks as conservation tools. *BioScience*, 51(11), 960-966.
- Shvachko, N. A., & Khlestkina, E. K. (2020). Molecular genetic bases of seed resistance to oxidative stress during storage. *Vavilov Journal of Genetics and Breeding*, 24(5), 451.
- Thirusendura Selvi, D., & Saraswathy, S. (2018). Seed viability, seed deterioration and seed quality improvements in stored onion seeds: a review. *The Journal of Horticultural Science and Biotechnology*, 93(1), 1-7.
- Wickham, H., & Wickham, H. (2016). Programming with ggplot2. *Ggplot2: elegant graphics for data analysis*, 241-253.