

BANCO DE SEMILLAS: COMPARACIÓN DE METODOLOGÍAS DE EXTRACCIÓN, DE DENSIDAD Y DE PROFUNDIDAD DE MUESTREO.

PIUDO, M.J. y CAVERO, R.Y.

Departamento de Botánica, Facultad de Ciencias, Universidad de Navarra, 31080 Pamplona, Navarra, España.

RESUMEN

PIUDO, M.J. y CAVERO, R.Y. (2005). Banco de semillas: comparación de metodologías de extracción, de densidad y de profundidad de muestreo. *Publ. Bio. Univ. Navarra, Ser. Bot., 16: 71-85.*

Desde otoño de 2002 se viene estudiando el banco de semillas del suelo en un carrascal de Navarra, que se incendió en 1994. El carrascal se encuentra en la localidad de Nazar, al noroeste de Navarra. A raíz del fuego se originaron dos zonas, control o no quemada y quemada. Dentro de la zona quemada se habilitó una parcela de 15x15m donde se aplicó un tratamiento de desbroce en la vegetación. En esas tres zonas se ha estudiado la regeneración de la flora vascular y su aceleración y dicho estudio se está completando con el análisis del banco de semillas del suelo. Para este análisis se toman muestras dos veces al año, una en otoño y otra en primavera, y se aplican dos metodologías distintas que permiten calcular el número de semillas: el método directo o de separación física (aplicando dos lavados distintos: con agua y con hexametáfosfato de sodio) y el método indirecto o de emergencia de plántulas. En este trabajo se presentan los resultados obtenidos en los dos primeros muestreos (otoño de 2002 y primavera de 2003), se comparan las metodologías empleadas y el número de semillas encontrado en cada zona y se estudia la influencia de la fecha de muestreo, así como la profundidad a la que se encuentran las semillas. El método directo parece ser más efectivo que el indirecto y los dos lavados efectuados son igualmente eficaces. Las tres zonas estudiadas difieren significativamente en cuanto a la densidad de semillas se refiere, encontrándose la menor densidad en la zona control y la mayor en la desbrozada. Aunque los datos son parciales, parece ser que la fecha de muestreo es un factor que no influye en el contenido de semillas y que éstas se reparten de igual forma a lo largo de los cinco primeros centímetros de suelo.

Palabras clave: densidad de semillas, carrascal, Navarra (España), método directo e indirecto, agua, hexametáfosfato de sodio.

SUMMARY

The soil seed bank has been studied in an evergreen oak stand in Navarra since 2002. Our study site is in Nazar, in northwestern of Navarra. A natural fire happened in 1994 which created two different areas where natural restoration and its acceleration was studied in the Department of Botany, in University of Navarra. Those, control and burned areas, and a 15x15 m area inside burnt area that was cleared of vegetation allowed us to study soil seed bank. Soil samples are taken twice a year, in autumn and in spring, and they are processed using two different methods: direct or with physical separation (where samples are subjected to two different treatments: water and sodium metaphosphate) and indirect or with emergent seedlings. This study aims to compare the different methodology used, the sampling time and the deep soil layers where seeds are. Density in the three areas is also studied. Only two samplings are analysed, autumn of 2002 and spring of 2003, so partial results are presented. The direct method seems to be more effective than the indirect and water and sodium metaphosphate do not differ in efficiency. The three areas are different in seed density, which is not determined by the sampling time. In the control area it is found the lowest density and in the cleared area the highest. The different depths analysed do not present differences, so the seeds seem to be equally found in the first five centimetres.

Key words: seed density, evergreen oak, Navarra (Spain), direct and indirect method, water, sodium metaphosphate.

INTRODUCCIÓN

Todas las semillas viables presentes en el suelo, sobre éste o asociadas a la hojarasca y la materia orgánica constituyen el banco de semillas del suelo (LECK *et al.*, 1989; BASKIN & BASKIN, 2001). Es un concepto dinámico ya que existe un flujo continuo de aportes y pérdidas de semillas, que le confieren una dimensión espacial. Los aportes están originados por la lluvia de semillas (dispersión local) y por la llegada de diásporas de otras zonas (dispersión a larga distancia). Las pérdidas se dan por germinación, por falta de viabilidad, por procesos de redispersión y por depredación, parasitismo y muerte fisiológica (REINÉ VIÑALES, 2002). El hecho de que haya una reserva de semillas en el suelo permite a las plantas disponer de numerosos propágulos listos para germinar cuando las condiciones son favorables, incluso cuando las poblaciones están ya en fases adultas (OLANO *et al.*, 2002)

Se puede hablar de tres grandes grupos de metodologías para analizar el banco de semillas del suelo (THOMPSON *et al.*, 1997): métodos de separación, métodos de germinación y métodos de enterramiento.

En la inmensa mayoría de los trabajos se utilizan los dos primeros métodos. El tercer método, que se encuentra muy en desuso, consiste en enterrar en campo las muestras de suelo a una profundidad conocida a la espera de la germinación de las semillas.

Los métodos de separación se dividen a su vez en: métodos de flotación y métodos de extracción tras lavados y tamizados. En el primero, las muestras se sumergen en una solución salina conocida que se agita y por flotación, las semillas suben y se aíslan fácilmente (BESNIER ROMERO, 1989; THOMPSON *et al.*, 1997). Esta metodología presenta un claro inconveniente y es que se debe conocer previamente la densidad de las semillas. Sería un método interesante en el caso de que el estudio del banco se centrara en una especie, pero no es aplicable para los estudios de bancos de semillas completos.

En los métodos de extracción tras lavados y tamizados, se consigue reducir el volumen de la muestra para su posterior procesado con la lupa binocular. El tamiz más pequeño que se ha usado y demostrado su efectividad es el de 0,212 mm (THOMPSON *et al.*, 1997), ya que existen pocas especies cuya semilla tenga un tamaño inferior a 0,5 mm, por ejemplo, las orquídeas y algunos juncos (FERRANDIS *et al.*, 1999). Los lavados pueden realizarse con agua o con un agente desagregante de suelo, como el hexametáfosfato de sodio (NaPO_3) (FERRANDIS *et al.*, 1996, 1999a, 1999b). Es recomendable utilizar sólo agua si después se va a estudiar la viabilidad de las semillas, ya que no se sabe qué efectos puede tener el hexametáfosfato de sodio sobre la viabilidad de las mismas. Es un buen método para encontrar semillas grandes, y además, tiene en cuenta las semillas en estado latente. Las desventajas que presenta son: su elevado requerimiento en tiempo y esfuerzo, su ineficacia frente a semillas de pequeño tamaño y la ausencia de claves de identificación de semillas que hace necesaria la recolección previa de ejemplares para la comparación. Así mismo, la viabilidad de las semillas encontradas debe comprobarse ya que, como se ha indicado anteriormente, la definición del banco de semillas hace referencia a las semillas viables presentes en el suelo (THOMPSON *et al.*, 1997).

El segundo grupo de metodologías, los métodos de germinación, se basan en la emergencia de plántulas y pueden realizarse en condiciones controladas (invernadero o cámara de crecimiento), o en campo, situación esta última que se asemeja bastante al tercer grupo de metodologías. Bajo condiciones controladas y para favorecer la germinación de todas las semillas, se extiende la muestra de suelo homogéneamente sobre un substrato estéril; se riega periódicamente y se espera a la aparición de las plántulas. Éstas deben extraerse tan pronto como sea posible (FERRANDIS *et al.*, 1996, 1999, 2001 y 2001a) para evitar fenómenos de competencia entre especies y favorecer la germinación del resto de semillas (FERRANDIS *et al.*, 1999, 2001 y 2001a). Si se desconoce el taxon, se trasplanta para que complete su desarrollo y

pueda ser identificado. El período de permanencia en el invernadero es variable, y depende, entre otros factores, del grosor de muestra ya que si las semillas quedan muy enterradas, estarán en peores condiciones para germinar (THOMPSON *et al.*, 1997). Las limitaciones a tener en cuenta de esta metodología son: no todas las semillas germinan bajo las mismas condiciones; no se tiene en cuenta las semillas en dormancia, que, siendo viables, están en estado de latencia y el espacio ocupado en el invernadero puede ser considerable. Ante este último punto, TER HEERDT *et al.*, (1996) hablan de reducir la muestra a través de tamizados y, comentan también que la eliminación de arcillas y otros materiales podría estimular la tasa de germinación por un aumento en el intercambio gaseoso y por un descenso en el potencial hídrico del suelo. Además, la reducción de muestra mediante tamizados reduce mucho el tiempo de permanencia en el invernadero (THOMPSON *et al.*, 1997). A pesar de las limitaciones citadas, las semillas de pequeño tamaño son detectadas y, VALBUENA y TRABAUD (1995) afirman que es el mejor método para los estudios a nivel de comunidad.

THOMPSON *et al.*, (1997) han demostrado que tras la reducción y puesta en germinación de la muestra, todas las semillas que quedan y que no han germinado son no viables. No obstante FERRANDIS *et al.*, (1996, 1999, 1999a, 1999b) afirman que el método de separación física de semillas es complementario al de emergencia de plántulas, ya que con la aplicación simultánea de ambos se tiene en cuenta tanto las semillas de pequeño tamaño como las semillas en estado de dormancia.

Según la revisión bibliográfica realizada por THOMPSON *et al.*, (1997), en el 70% de los estudios no se aplica ningún tratamiento, ni de reducción ni de extracción de semillas, simplemente se ponen a germinar. En el 20%, se reduce el volumen de muestra antes de poner a germinar, o de extraer las semillas y de comprobar su viabilidad. Finalmente, en el 10% restante se aplica el método de enterramiento de semillas.

En todos los trabajos revisados, el muestreo se realiza dos veces al año, una en otoño (antes de la germinación, tras su estratificación en el invierno) y otra en primavera (antes de los nuevos aportes). Es así como se tienen en cuenta tanto las semillas ya presentes de otras temporadas como las nuevas incorporaciones.

Normalmente, la densidad de semillas en un suelo resulta favorecida por las altas intensidades de perturbación en la vegetación, sin embargo, en cuanto a la composición de especies, no hay un criterio unificado (REINÉ VIÑALES, 2002): hay autores que afirman que a lo largo de una sucesión, el número de especies disminuye, pero, también hay trabajos que afirman que, a diferencia de las densidades de semillas, la riqueza de especies del banco no varía con la edad sucesional de la comunidad.

La profundidad es un factor que determina la composición y densidad del banco de semillas siendo más viejas las semillas enterradas a mayor profundidad que las superficiales. En muchos casos, las que se encuentran a mayor profundidad se convierten en la memoria evolutiva de la vegetación pasada de la comunidad (REINÉ VIÑALES, 2002). Por tanto es de esperar que se encuentren diferencias en los contenidos de semillas muestreados a distintas profundidades de suelo.

En este trabajo se comparan las metodologías empleadas para el análisis del banco de semillas, y se presentan y comparan los datos de la densidad de semillas en el suelo en las distintas zonas del carrascal de estudio, en dos fechas distintas y a diferentes profundidades.

MATERIAL Y MÉTODOS

El carrascal se encuentra situado en la falda de la Sierra de Codés (30TWN5922), sobre sustratos básicos y con una pendiente media del 34% (ALBERDI y CAVERO, 2003). Pertenece a la serie meso-supra mediterránea castellano-cantábrica y colino-montana cántabro-euskalduna basófila de la carrasca o *Quercus rotundifolia*, *Spiraeo obovatae-Querceto rotundifoliae sigmetum* y a la serie meso-supramediterránea castellano-cantábrica del quejigo o *Quercus faginea*, *Spiraeo obovata-Querceto fagineae sigmetum* (LOIDI y BASCONES, 1995). Biogeográficamente, está situada en el Reino Holártico, Región Mediterránea, Subregión Mediterránea Occidental, Superprovincia Mediterráneo-Iberolevantina, Provincia Aragonesa, Sector Castellano-Cantábrico y Subsector Estellés-Romanzado y tiene una climatología caracterizada por un bioclima Mediterráneo pluviestacional oceánico, con termotipo supramediterráneo y ombrotipo subhúmedo (ALBERDI, 2003).

Se han utilizado las mismas zonas en las que ALBERDI (2003) ha estudiado la flora y la restauración vegetacional, y son:

-Una zona control (Imagen 1), que no se vio afectada por el fuego y que posee un estrato arbóreo y arbustivo bien desarrollado.

-Una zona quemada (Imagen 2), en donde no se haya representado el estrato arbóreo.

-Una zona desbrozada (Imagen 3), pequeña parcela de 15x15m situada dentro del carrascal quemado y a la que se aplicó un tratamiento de desbroce de la vegetación para la realización de diversos experimentos.



Imagen 1. Panorámica zona control.



Imagen 2. Panorámica zona quemada.



Imagen 3. Panorámica zona desbrozada.

El muestreo se realiza dos veces al año, una en otoño, antes de que se de la germinación de las semillas que caen en esa época y otra en primavera, después de la estratificación natural que se produce en el invierno y antes de la lluvia de semillas (FERRANDIS *et al.*, 1996, 1999, 1999a, 1999b, 2001, 2001a; Peco *et al.*, 1998; TER HEERDT *et al.*, 1996; THOMPSON *et al.*, 1997).

En la zona control se toman tres muestras de suelo y en la zona quemada y desbrozada cinco; esta diferencia en el número de muestras se debe a que, después del estudio de la flora y vegetación de la zona, (ALBERDI y CAVERO, 1999, 2001, 2002, 2003) se demuestra que hay una menor heterogeneidad y riqueza florística en la zona control.

Para la toma de muestras se delimitan áreas de 20x60 cm en las que se extrae con un cilindro corex la superficie de suelo marcada (FERRANDIS *et al.*, 1996, 1999a, 1999b, 2001a). En la zona quemada, la alta pedregosidad del terreno hace que en ocasiones se tenga que utilizar una pequeña hazada para la extracción del suelo. Concretamente, se extraen los cinco primeros centímetros, profundidad en la que normalmente se encuentran las semillas en los ecosistemas mediterráneos y principalmente en los dos primeros centímetros (BESNIER ROMERO, 1989; VALBUENA & TRABAUD, 2001), de ahí la razón por la que se separan éstos de los tres restantes. Como queda patente en la definición de banco de semillas citada anteriormente, las semillas pueden estar asociadas a la hojarasca, por tanto, en el muestreo de otoño también se recoge (BESNIER ROMERO, 1989).

Las muestras son transportadas al laboratorio en bolsas de plástico, y una vez allí, se extienden en bandejas para eliminar toda la humedad que contengan. Tras secarse y para eliminar las piedras y restos vegetales, se tamiza el suelo en seco utilizando un tamiz de 2 mm de luz.

El resultado del tamizado se divide en dos submuestras: una para la aplicación del método directo o de separación física, y otra para la del método indirecto o de emergencia de plántulas.

Para la aplicación del método directo o de separación física, se vuelve a tamizar la muestra (tamiz 0,5 mm), pero esta vez sometiéndola simultáneamente a un lavado. Para ello, se divide a la muestra en dos y en cada una se aplican un agente distinto: agua y un desagregante de suelo (FERRANDIS *et al.*, 1996, 1999, 1999a, 1999b), Hexametáfosfato de sodio (NaPO_3) al 10%. Se comparan las eficacias de ambas sustancias siendo esperable que sea más completo el lavado con el hexametáfosfato de sodio por el hecho de eliminar con más facilidad las partículas de suelo; pero si la efectividad de ambos es similar, en próximos estudios sólo se utilizará agua y así se elimina el riesgo de afección a la viabilidad de las semillas. Se deja secar la muestra y se extraen todas las semillas allí presentes utilizando una lupa binocular. La identificación se realiza por comparación con una colección de semillas realizada

previamente con material de la zona, o con la escasa bibliografía existente al respecto como ALBERDI (2003), FLOOD (1986) y MARTIN & BARKLEY (2000).

Para el método indirecto o de emergencia de plántulas, se estratifica la submuestra, sometiéndola a condiciones de frío y oscuridad para que las semillas que están en letargo salgan de él y estén en condiciones de germinar (FERRANDIS *et al.*, 1996, 1999a, 1999b; THOMPSON *et al.*, 1997). La estratificación se realiza en un frigorífico a unos 4°C colocando las muestras durante unas 4 semanas aproximadamente.

A continuación se extiende la submuestra sobre una capa de unos 2 mm de espesor de substrato estéril (turba) intentando que el suelo quede muy bien repartido, para que todas las semillas allí contenidas tengan las mismas oportunidades de germinar.

Las bandejas son regadas periódicamente y se espera a la aparición de plántulas, que deben extraerse tan pronto como sea posible para evitar fenómenos de competencia. En el caso de desconocer el taxon al que pertenecen, se trasplantan y se espera a que completen su ciclo para ser perfectamente identificadas.

En la Tabla 1 se presentan los resultados globales de este estudio, donde ZONAS, son las tres zonas estudiadas, control, quemada y desbrozada; PUNTOS, son los puntos de muestreo de cada zona; HORIZONTES, son las dos profundidades tenidas en cuenta, es decir, 0-2 cm y 2-5 cm; dentro de los MÉTODOS, se distingue entre el INDIRECTO o de emergencia de plántulas y el DIRECTO, o de separación física, en donde a su vez se diferencian dos lavados, con AGUA y con METAFOSFATO (hexametáfosfato de sodio). 1° M y 2° M hacen referencia al primer y segundo muestreo respectivamente, es decir, a otoño de 2002 y primavera de 2003.

Para comparar las distintas metodologías empleadas, y dentro del método directo, los dos lavados utilizados, se ha utilizado el Test de Kruskal-Wallis (por la falta de normalidad en las muestras) y para profundizar en las diferencias encontradas entre los métodos se aplica el Test de U de Mann Whitney, que compara las muestras dos a dos. Para comparar las fechas y las zonas de muestreo, así como las distintas profundidades estudiadas se ha empleado el Test de ANOVA de dos criterios con repetición con los datos transformados en rangos (por la falta de heterogeneidad en las varianzas), y si de la aplicación de este test se obtienen diferencias significativas, se continúa aplicando Tests de U de MannWhitney comparando muestras dos a dos.

Para el análisis estadístico de los datos, se ha utilizado el programa SPSS 11.0 y los manuales de GARCÍA-GRANERO y CALASANZ (1999, 1999a). La significación tenida en cuenta es 0,05.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos durante el año de estudio sobre la densidad de semillas (semillas/ m²) en cada zona, puntos de muestreo, horizontes, distintos métodos y lavados aparecen en la Tabla 1.

Tabla 1: Densidad de semillas (semillas/m²) encontrada en la zona de estudio. Para nomenclatura ver texto.

ZONAS	PUNTO	HORIZONTE	MÉTODOS					
			INDIRECTO		DIRECTO			
			1ºM	2ºM	AGUA		METAFOSFATO	
				1ºM	2ºM	1ºM	2ºM	
CONTROL	1	0-2cm	0,00	91,67	33,33	0,00	33,33	0,00
		2-5cm	0,00	241,67	33,33	0,00	16,67	8,33
	2	0-2cm	8,33	0,00	50,00	8,33	33,33	0,00
		2-5cm	8,33	0,00	0,00	0,00	8,33	16,67
	3	0-2cm	0,00	0,00	8,33	8,33	8,33	16,67
		2-5cm	0,00	0,00	25,00	8,33	8,33	25,00
QUEMADA	1	0-2cm	16,67	83,33	150,00	108,33	33,33	91,67
		2-5cm	25,00	208,33	225,00	308,33	183,33	183,33
	2	0-2cm	25,00	50,00	150,00	116,67	175,00	100,00
		2-5cm	83,33	75,00	91,67	125,00	100,00	0,00
	3	0-2cm	58,33	0,00	266,67	16,67	150,00	16,67
		2-5cm	58,33	16,67	241,67	41,67	191,67	16,67
	4	0-2cm	33,33	91,67	283,33	150,00	300,00	133,33
		2-5cm	33,33	125,00	125,00	141,67	150,00	166,67
	5	0-2cm	41,67	66,67	75,00	216,67	108,33	266,67
		2-5cm	0,00	41,67	58,33	150,00	41,67	116,67
DESBROZADA	1	0-2cm	58,33	450,00	825,00	1375,00	700,00	1425,00
		2-5cm	50,00	191,67	316,67	425,00	141,67	483,33
	2	0-2cm	16,67	6233,33	558,33	333,33	375,00	1333,33
		2-5cm	0,00	1608,33	191,67	208,33	508,33	441,67
	3	0-2cm	33,33	516,67	2783,33	866,67	2325,00	825,00
		2-5cm	16,67	358,33	550,00	400,00	533,33	541,67
	4	0-2cm	41,67	225,00	1391,67	708,33	1566,67	458,33
		2-5cm	25,00	150,00	725,00	383,33	758,33	458,33
	5	0-2cm	16,67	150,00	300,00	633,33	291,67	566,67
		2-5cm	41,67	75,00	133,33	425,00	100,00	383,33

Análisis de las metodologías empleadas.

En la Figura 1 se representan las semillas encontradas con cada método. Las diferencias observadas entre los lavados empleados son pequeñas, mientras que las observadas entre el método indirecto y el directo son importantes, lo que parece indicar una menor efectividad del primero.

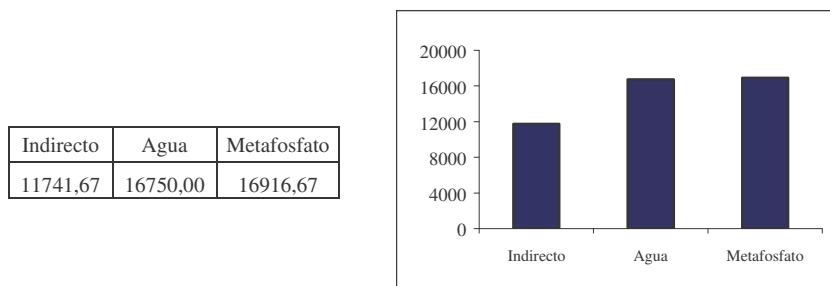


Figura 1. Semillas/m² detectadas con cada método.

Para comprobar si las diferencias son estadísticamente significativas, se aplica el Test de Kruskal Wallis, que indica que lo son ($p=0,00$), y se profundiza aplicando test de U de Mann Whitney que compara muestras dos a dos obteniendo como resultado que entre los dos lavados no existen diferencias ($p=0,822$), y sin embargo, entre el método indirecto y el directo (no importa con qué lavado) las diferencias son altamente significativas ($p=0,000$ para el lavado con agua y $p=0,001$ para el hexametáfosfato de sodio).

Según THOMPSON *et al.*, (1997), el método más efectivo y utilizado es el indirecto pero a la vista de los resultados que se presentan, parece que es mucho más efectivo el método de separación física. Esta afirmación ha de ser corroborada con los datos que se obtengan del estudio de la viabilidad de las semillas aisladas mediante el método directo.

Estos resultados no son del todo concluyentes, ya que en el método indirecto se recuentan semillas viables, y con el directo, bien sea lavado con agua o con metafosfato, se detectan semillas viables y en estado de dormancia. Entre los distintos lavados no hay diferencias, por lo que en próximas actuaciones sólo se empleará agua. El Hexametáfosfato de sodio es un agente químico y quizás pueda afectar a la viabilidad de las semillas aisladas.

Hay que destacar que durante la puesta a punto del invernadero para el análisis de las muestras de otoño de 2002 se encontraron problemas con unos gatos que interferían en el estudio. Quizás este factor haya influido en los resultados ya que durante los siguientes experimentos se ha visto que el número de plántulas que

aparecen es mayor. Con todo, y de acuerdo con FERRANDIS *et al.*, (1996, 1999, 1999a, 1999b) parece verificarse la necesidad de aplicar ambos métodos de estudio del banco de semillas por ser complementarios.

Densidad del banco de semillas en las distintas zonas.

En la Figura 2 se presentan las densidades medias (media de los puntos de muestro) del banco de semillas de cada zona en los dos muestreos efectuados (1ºM, otoño de 2002, y 2ºM, primavera de 2003).

La densidad de semillas es mayor en el segundo muestreo en la zona control y en la zona desbrozada y menor en la quemada.

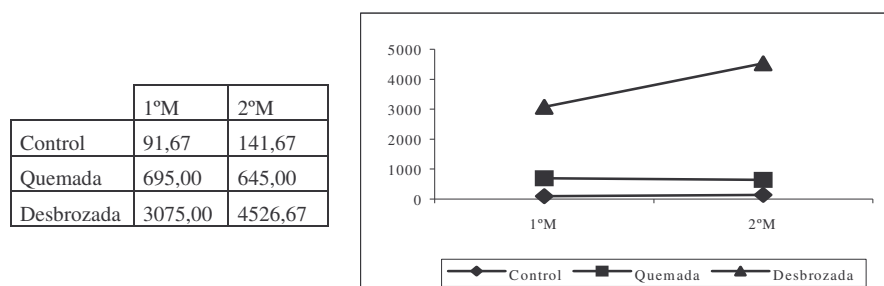


Figura 2. Densidad de semillas (semillas/m²) encontrada en las tres zonas de estudio en los dos muestreos (1º M, otoño de 2002, 2ºM, primavera de 2003).

Puede que la fecha de muestreo sea la causante de estas diferencias de densidad de semillas presentes en las distintas zonas y para comprobarlo se aplica el Test de Anova de dos criterios (zona y fechas) con repetición, transformando los datos en rangos. La interacción entre zona y fecha no es significativa ($\chi^2 = 4,32$; 2 g.l.; $0,10 < p < 0,25$), es decir, las diferencias entre las zonas no dependen de la fecha de muestreo y viceversa, por ello se puede profundizar independientemente en las diferencias en cada uno de los factores. Respecto a las fechas de muestreo, las diferencias son no significativas en la densidad de semillas ($\chi^2 = 0,90$; 1 g.l., $p > 0,25$), mientras que las zonas presentan diferencias altamente significativas ($\chi^2 = 82,97$; 2 g.l., $p < 0,001$). Para profundizar en esas diferencias, se aplican Tests de U de Mann-Whitney que comparan las zonas dos a dos, y el resultado indica diferencias altamente significativas entre todas las zonas ($p = 0,00$). En la Figura 3 se representan las densidades medias (media de los dos muestreos) de semillas por zona.

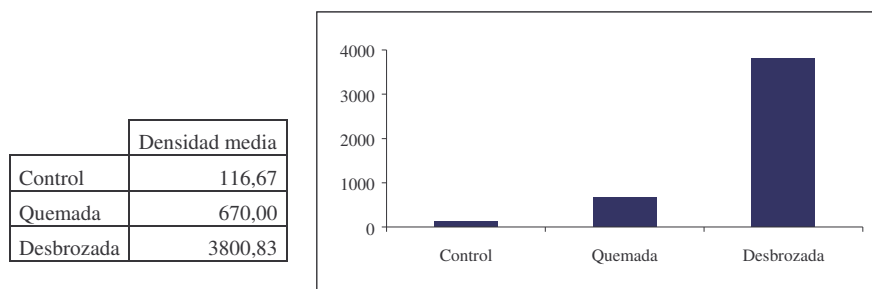


Figura 3. Densidad media de semillas en casa zona.

El hecho de que la zona control sea la que menor densidad de semillas presenta concuerda con los resultados del estudio de la flora y vegetación de la zona efectuado por ALBERDI (2003) donde se afirma que esta zona es la que menor riqueza y diversidad florística presenta, dándose además un empobrecimiento general debido principalmente a la influencia de la continentalidad. Así, es esperable que donde menor número de individuos haya, la cantidad de semillas sea también menor. Las zonas perturbadas suelen presentar una densidad mayor de semillas (REINÉ VIÑALES, 2002). Las diferencias existentes entre las dos zonas perturbadas quizás encuentren su justificación en la topografía. La zona quemada presenta mayor pendiente y pedregosidad que la desbrozada, factor que dificulta el establecimiento de la flora y que puede interferir en la densidad de semillas del suelo.

En todos los trabajos revisados se efectúan dos muestreos al año: uno a la salida del invierno o al comienzo de la primavera, momento en el que la estratificación de las semillas durmientes ha concluido y no ha comenzado todavía el aporte de nuevas semillas al suelo, obteniéndose información de bancos de semillas persistentes (REINÉ VIÑALES, 2002). El otro muestreo se realiza en otoño, momento en el que se tiene en cuenta la lluvia de semillas y da información de la viabilidad de las semillas que acaban de formar parte del banco (THOMPSON *et al.*, 1997). Aunque en este trabajo se han encontrado diferencias entre ambos muestreos, estadísticamente son no significativas debido quizás a no disponer de repeticiones en el tiempo que nos permitan realizar un estudio más generalizado. Con el procesamiento del resto de muestras pueden cambiar estos resultados.

Profundidad de muestreo.

Se ha calculado la densidad media de semillas de cada horizonte y los datos resultantes son: 1194,55 semillas/m² en el horizonte superficial y 657,69 semillas/m² en el inferior. A simple vista, parece que, de acuerdo con BESNIER ROMERO (1989) y VALBUENA y TRABAUD (2001), las semillas se concentran sobre todo en los dos centímetros superficiales de suelo. Para ver si estas diferencias son

estadísticamente significativas, se aplica el Test de Anova de 2 criterios con repetición transformando los datos en rangos. Los dos factores analizados (zona y profundidad) no presentan interacción ($\chi^2 = 1,21$; 2 g.l.; $p > 0,25$), es decir, las diferencias presentes entre las zonas no dependen de la profundidad y viceversa. Este mismo test nos da información de las profundidades de muestreo, y se ve que las diferencias encontradas son no significativas ($\chi^2 = 0,57$; 1 g.l.; $p > 0,25$). Las diferencias entre zonas vuelven a salir estadísticamente significativas, pero este punto se ha tratado anteriormente ($\chi^2 = 82,97$; 2 g.l.; $p < 0,001$).

Al igual que ocurre con las diferencias halladas entre las fechas de muestreo, los resultados estadísticos de la profundidad no concuerdan con los obtenidos en la bibliografía, quizás también debido a que nuestros resultados son parciales, sólo de un año.

CONCLUSIÓN

De los resultados obtenidos durante un año de estudio, podemos concluir que el método directo parece ser más efectivo que el indirecto, si bien estos resultados han de ser confirmados una vez que se haya comprobado la viabilidad de las semillas aisladas. En cuanto a los dos lavados efectuados, ambos son igualmente eficaces. Las tres zonas estudiadas difieren significativamente en cuanto al contenido de semillas se refiere, encontrándose la menor densidad en la zona control y la mayor en la desbrozada. Aunque los datos son parciales, parece ser que la fecha de muestreo es un factor que no influye en el contenido de semillas y que éstas se reparten de igual forma a lo largo de los cinco primeros centímetros de suelo.

AGRADECIMIENTOS

Este estudio no hubiera sido posible sin la ayuda recibida por la empresa Gestión Ambiental Viveros y Repoblaciones de Navarra S.A. que nos permitieron utilizar sus invernaderos.

BIBLIOGRAFÍA

- ALBERDI, L. (2003). Recuperación de la flora y vegetación post-incendio y aplicación de técnicas que puedan acelerarla. *Tesis doctoral inédita. Universidad de Navarra.*
- ALBERDI, L. y CAVERO, R.Y., 1999.— Regeneración post-incendio y dinámica de la vegetación en dos carrascales de Navarra. *Actas de las XVII Jornadas de fitosociología*: 113-129. Jaén.
- ALBERDI, L. y CAVERO, R.Y., 2001.— Desarrollo de técnicas que aceleran el proceso de recuperación de la flora vascular tras un incendio en un carrascal

- de Navarra. *Actas del III Congreso forestal Español*, Mesa 3: 521-526. Sierra Nevada, Granada.
- ALBERDI, L. and CAVERO, R.Y., 2002.— Effect of fire on the undestoryspecies of a *Quercus ilex* L. subsp. *ballota* (Desf.) Samp. Forest in Navarra, Spain. In Trabaud, L. & Prodon, R. (eds.). *Fire and Biological Processes*, 25-32 pp. Backhuys Publishers. Leiden.
- ALBERDI, L. y CAVERO, R.Y. (2003). Flora vascular post-incendio en un carrascal de Nazar (Navarra). *Publ. Bio. Univ. Navarra, Ser. Bot.*, 15: 1-17.
- BASKIN, C.B. and BASKIN, M.B. (2001). *Seeds. Ecology, Biogeography, and Evolution of Dormancy and Germination*. Academic Press. 666 p.p.
- BESNIER ROMERO, F., 1989. *Semillas. Biología y Tecnología*. Ediciones Mundi-Prensa. 637 p.p.
- FERRANDIS, P., HERRANZ, J.M. & MARTÍNEZ-SÁNCHEZ, J.J., (1996). The role of soil seed bank in the early stages of plant recovery after fire in *Pinus pinaster* Forest in SE Spain. *Int. J. Wildland Fire* 6(1): 31-35.
- FERRANDIS, P., HERRANZ, J.M. & MARTÍNEZ-SÁNCHEZ, J.J., (1999a). Effect of fire on hard-coated Cistaceae seed banks and its influence on techniques for quantifying seed banks. *Plant Ecology* 144: 103-144.
- FERRANDIS, P., HERRANZ, J.M. & MARTÍNEZ-SÁNCHEZ, J.J., (1999b). Fire impact on a maquis soil seed bank in Cabañeros national Park (central Spain). *Israel Journal of Plant Sciences*, 47: 17-26.
- FERRANDIS, P., HERRANZ, J.M., MARTÍNEZ-SÁNCHEZ, J.J., (2001a). Response to fire of a predominantly transient seed bank in a Mediterranean weedy pasture (eastern-central Spain). *Ecoscience* 8(2): 211-219.
- FERRANDIS, P., DE LAS HERAS, J., MARTÍNEZ-SÁNCHEZ, J.J. and HERRANZ, J. M., (2001). Influence of a low-intensity fire on a *Pinus halepensis* Mill. forest seed bank and its consequences on the early stages of plant succession. *Israel Journal of Plant Sciences*, 49: 105-114.
- FERRANDIS, P., MARTÍNEZ-SANCHEZ, J.J., AGUDO, A., CANO, A. L., GALLAR, J.J., HERRANZ, J. M., (1999). Presencia de especies del género *Cistus* L. (Cistaceae) en el banco de semillas del suelo en el pastizal de la raña del parque nacional de Cabañeros. *Invest. Agr. Sist. Recur. For. Vol. 8(2): 361-376*.
- FLOOD, R.J., 1986. *Seed Identification Handbook*. National Institute of Agricultural Botany, Cambridge. 72 pp.

- GARCÍA GRANERO, M. y CALASANZ ABÍNZANO, M.J., 1999. *Estadística en Biología y Ciencias de la Salud. Interpretación de datos con SPSS y otras aplicaciones informáticas*. Newbook ediciones. Pamplona. 154 p.p.
- GARCÍA GRANERO, M. y CALASANZ ABÍNZANO, M.J., 1999a. *Manual práctico de Estadística Básica con SPSS para Windows 9.0*. Newbook ediciones. Pamplona. 174 p.p.
- LECK, M.A.; PARKER, V.T. and SIMPSON, R.L. (1989). *Ecology of Soil Seed Banks*. Academic Press Inc. 461 pp. San Diego, California.
- LOIDI, J. y BASCONES, J.C., (1995). *Memoria del Mapa de Series de Vegetación de Navarra. E: 1:200.000*. Gobierno de Navarra. Departamento de Ordenación del Territorio y Medio Ambiente. 99 p.p.
- MARTIN, A.C. and BARKLEY, W.D., 2000. *Seed Identification Manual*. The Blackburn press. Library of Congress Catalog, 221 p.p.
- OLANO, J.M.; CABALLERO, I; LASKURAIN, N.A; LOIDI, J. & ESCUDERO, A. (2002). Seed bank spatial pattern in a temperate secondary forest. *Journal of Vegetation Science*, 13(6): 775-784, 2002.
- PECO, B.; ORTEGA, M. & LEVASSOR, C., 1998.— Similarity between seed bank and vegetation in Mediterranean grassland: a predictive model. *Journal of Vegetation Science* 9: 815-828, 1998.
- REINÉ VIÑALES, R.J., (2002). *Composición del banco de semillas del suelo en prados pirenaicos y alpinos*. Publicaciones del Consejo de Protección de la Naturaleza de Aragón. 258 p.p.
- TER HEERDT, G.N.J., VERWEIJ, G.L., BEKKER, R.M. & BAKKER, P., 1996. An improved method for seed-bank analysis: seedling emergence after removing the soil by sieving. *Functional Ecology* 10, 144-151.
- THOMPSON, K., BAKKER, J. & BEKKER, R., (1997). *The soil seed banks of North West Europe: methodology, density and longevity*. Cambridge University Press. United Kingdom. 276 p.p.
- VALBUENA, L. & TRABAUD, L. (1995). Comparison between the soil seed banks of a burnt and an unburnt *Quercus pyrenaica* Willd. forest. *Vegetatio*, 119: 81-90, 1995.
- VALBUENA, L. & TRABAUD, L. (2001). Contribution of the soil seed bank to post-fire recovery of a heathland. *Plant Ecology* 152: 175-183.