

22(2)

Primeros datos sobre  
producción, fenología y  
viabilidad de semillas de la  
fanerógama marina *Zostera  
noltei* en los estuarios del  
País Vasco



Joxe Mikel Garmendia

Garmendia, J.M. 2015. Primeros datos sobre producción, fenología y viabilidad de semillas de la fanerógama marina *Zostera noltei* en los estuarios del País Vasco. *Revista de Investigación Marina, AZTI-Tecnalia*, 22(2): 15-32

La serie '*Revista de Investigación Marina*', editada por la Unidad de Investigación Marina de Tecnalia, cuenta con el siguiente Comité Editorial:

**Editor:** Dr. Ángel Borja

**Adjunta al Editor:** Dña. Mercedes Fernández Monge e Irantzu Zubiaur  
(coordinación de las publicaciones)

**Comité Editorial:** Dr. Lorenzo Motos  
Dr. Adolfo Uriarte  
Dr. Michael Collins  
Dr. Javier Franco  
D. Julien Mader  
Dña. Marina Santurtun  
D. Victoriano Valencia  
Dr. Xabier Irigoien  
Dra. Arantza Murillas  
Dr. Josu Santiago

La '*Revista de Investigación Marina*' de Tecnalia edita y publica investigaciones y datos originales resultado de la Unidad de Investigación Marina de Tecnalia. Las propuestas de publicación deben ser enviadas al siguiente correo electrónico [aborja@azti.es](mailto:aborja@azti.es). Un comité de selección revisará las propuestas y sugerirá los cambios pertinentes antes de su aceptación definitiva.



Edición: 1.<sup>a</sup> Septiembre 2015

© AZTI

ISSN: 1988-818X

Unidad de Investigación Marina

Internet: [www.azti.es](http://www.azti.es)

Edita: Unidad de Investigación Marina de Tecnalia

Herrera Kaia, Portualdea

20110 Pasaia

Foto portada: © Iñigo Onandia

© AZTI 2014. Distribución gratuita en formato PDF a través de la web: [www.azti.es/RIM](http://www.azti.es/RIM)

# Primeros datos sobre producción, fenología y viabilidad de semillas de la fanerógama marina *Zostera noltei* en los estuarios del País Vasco

Garmendia, J.M.<sup>1</sup>

## Resumen

A pesar de que el nivel de conocimiento de las praderas marinas de la costa vasca ha aumentado en años recientes (identificación de todas o casi todas las poblaciones existentes, sus cartografiados, sus tendencias, descripción de sus hábitats, presiones humanas que les afectan, escenarios futuros con relación al cambio climático), apenas se conoce su reproducción sexual: fenología de la producción de semillas, viabilidad de las mismas, dispersión, etc. Para cubrir este vacío de conocimiento, se efectuaron unos experimentos (en laboratorio y campo) que han permitido concluir lo siguiente: (1) *Zostera noltei* florece entre junio y noviembre (ambos inclusive) en el medio natural; (2) los mejores meses para recoger semillas de *Zostera noltei* son octubre y noviembre; (3) el porcentaje medio de germinación de las semillas del Oka y del Bidasoa es de 74,4% (d.e. 17,3); (4) en 7 días germinó el 49% (d.e. 4,7) de las semillas; y en 16 días germinó el 61% (d.e. 12,6); (5) las semillas sembradas en el campo han producido plantas en menos de un año; y (6) no se han podido conseguir plántulas a partir de semillas en laboratorio. Dado el carácter exploratorio de este trabajo, la información obtenida debe servir de orientación a la hora de realizar nuevos estudios con el fin de evaluar la utilidad de las semillas en actuaciones de restauración y la importancia de la reproducción sexual en las poblaciones de *Zostera noltei* del País Vasco.

**Palabras clave:** *Zostera noltei*, praderas marinas, fenología, semillas, germinación, viabilidad, País Vasco

## Abstract

Although the level of knowledge of the seagrasses of the Basque Country has increased in recent years (identification of all or almost all existing populations, distribution maps, tendencies, habitats description, affecting human pressures, future scenarios related to climatic change), the reproductive cycle is hardly known: phenology of seed production, seeds viability, dispersion, etc. To cover this gap of knowledge, some field and laboratory experiments were carried out, which have allowed to know the following aspects: (1) the flowers of *Zostera noltei* occur between June and November (both included); (2) the best months to collect seeds are October and November; (3) the rate of germination of the seeds from Oka and Bidasoa is 74% (s.d. 17.3); (4) 49% (s.d. 4.7) of the seeds germinated in 7 days; and 61% (s.d. 12.6) in 16 days; (5) the seeds sown in the field have produced plants; and (6) no seedling was obtained from seeds in laboratory. The information obtained is the result of exploratory tests and could be serve as guidance in more accurate tests that may run in the future with the objective of evaluation of seed usefulness in restoration works and relevance of sexual reproduction in *Zostera noltei* populations of the Basque Country.

**Keywords:** *Zostera noltei*, seagrasses, phenology, seeds, germination, viability, Basque Country

## Introducción

La fanerógama marina *Zostera noltei* Hornemann, 1832, es una especie de amplia distribución en las zonas intermareales de la costa del nordeste atlántico, desde Noruega a Mauritania,

así como en gran parte del mar Mediterráneo y mar Negro (Vermaat *et al.*, 1993; Philippart, 1995; Auby y Labourg, 1996; Milchakova, 1999). Se encuentra bien distribuida a lo largo de toda la costa del mar Cantábrico (Laborda *et al.*, 1997) encontrándose en 3 (Oka, Lea y Bidasoa) de los 12 estuarios del País Vasco.

En el País Vasco, hasta épocas recientes, los datos de esta especie corresponden a algunas citas aisladas, principalmente por parte de botánicos que se limitan a datos de presencia de

<sup>1</sup> AZTI; Unidad de Investigación Marina; Herrera Kaia, Portualdea z/g; 20110 Pasaia; Gipuzkoa; España. jgarmendia@azti.es

fanerógamas marinas (Bubani, 1897-1900; Gredilla, 1913; Catalan y Aizpuru, 1985, 1986; Laborda *et al.*, 1997; Campos y Silván, 2001; Silván y Campos, 2002). En los informes de la *Red de seguimiento del estado ecológico de las aguas de transición y costeras de la Comunidad Autónoma del País Vasco* se comenzó a proporcionar información de abundancias y coberturas (Borja *et al.*, 2005), y ya desde 2007 se comenzaron a obtener cartografías de las praderas marinas (Otxoa, 2007) y a profundizar en el estudio de las praderas marinas del País Vasco (Garmendia *et al.*, 2008, 2010, 2013; Valle *et al.*, 2010, 2011, 2014, 2015). También hay otros estudios interesantes en parte de la población del Bidasoa (Lissardy *et al.*, 2007; Sanchez *et al.*, 2010, 2013, 2014).

En la actualidad, las praderas marinas del País Vasco están formadas por una única especie, *Zostera noltei*, y están presentes en 3 de los 12 estuarios vascos (Oka, Lea y Bidasoa), en su zona intermareal, ocupando una superficie de 19,8 ha (Garmendia *et al.*, 2013), que probablemente es inferior a la que había en el pasado (Valle, 2014). En un contexto de preocupación por el estado de las praderas, por su conservación y recuperación, en años recientes se están llevando a cabo actuaciones piloto de restauración mediante trasplantes de ejemplares adultos (Valle, 2014). A pesar de que en estas actuaciones no se ha visto una afección a medio plazo en las poblaciones donantes, la escasa superficie de praderas presentes en el País Vasco aconseja explorar otros métodos para intentar ampliar la extensión de tales poblaciones.

Una de estas alternativas puede ser la utilización de semillas, en lugar de trasplantes con ejemplares adultos. El empleo de semillas, si se demostrara viable, supondría un método carente de impacto sobre las poblaciones naturales, que se reproducen y expanden casi exclusivamente mediante reproducción vegetativa.

El uso de las semillas de *Zostera* spp. en restauración de praderas marinas es un campo de estudio bastante reciente, en el que están trabajando varios grupos de investigación en la actualidad (Alexandre *et al.*, 2006; Marion y Orth, 2010a; Morita *et al.*, 2010; Kishima *et al.*, 2011; Dooley *et al.*, 2013; Berkovic *et al.*, 2014). Es evidente que el éxito de esta metodología ofrecería una alternativa muy beneficiosa en el campo de la restauración de praderas; sin embargo, los resultados obtenidos hasta el momento no son muy prometedores. No obstante, se han obtenido buenos resultados con otras especies de fanerógamas marinas y se están desarrollando metodologías para su uso en proyectos de restauración (Harwell y Orth, 1999; Busch *et al.*, 2010; Golden *et al.*, 2010; Marion y Orth, 2010b; Tanner y Parham, 2010; Orth *et al.*, 2011; Pan *et al.*, 2012; Statton *et al.*, 2012). Por ello, este es un campo que requiere una mayor investigación.

En el caso del País Vasco, no se dispone de ninguna información referida a la fenología, producción y viabilidad de semillas de *Zostera noltei*. Ante este vacío de conocimiento, nos hemos planteado unas preguntas que pueden servir de punto de partida para futuras investigaciones: ¿En qué época florece *Zostera noltei* en las poblaciones del País Vasco? ¿Cómo se pueden obtener semillas? ¿Cuándo se pueden recoger semillas?

¿Son viables estas semillas? ¿Se pueden obtener plántulas en laboratorio? ¿Se deben plantar semillas o plántulas?

Para responder a estas preguntas se han llevado a cabo estudios de campo y laboratorio que deben considerarse como pruebas exploratorias que buscan una orientación y pueden servir como contribución y ayuda para estudios más profundos que se pudieran ejecutar en un futuro.

## Material y métodos

### 1. Fenología reproductora de *Zostera noltei*

Es muy difícil distinguir las flores en el campo, dado que inicialmente apenas se diferencian, ni en forma ni en color, de las hojas vegetativas. A medida que van madurando, las hojas reproductoras van adquiriendo primero una coloración más clara y más tarde se tornan marrones. Estas hojas reproductoras o flores participarán en la fecundación y posteriormente serán las portadoras de las semillas. Además, aunque se identifiquen las hojas reproductoras, en muchos casos aún no están abiertas (por no estar completamente desarrolladas); y, si están abiertas, no se puede saber si llevan óvulos fecundados (que se convertirán en semillas) o no. En el campo es muy difícil distinguir las semillas, dado su tamaño (aprox. 2-3 mm de longitud y 1 mm de grosor) y su ubicación en la base de la planta. Por lo tanto, para recoger semillas se sigue una estrategia indirecta: en primer lugar se recogen las flores (sin conocer en realidad si lleva semillas o no) y posteriormente se intentan extraer las semillas que pudieran llevar en su interior (sin saber si han sido fecundadas o no).

Por ello, la presencia de flores indica la potencialidad de la población para producir semillas y, de esta manera, llevar a cabo la reproducción sexual. Por tanto, para que no haya confusión con los términos, llamaremos flores a las hojas reproductoras o espádices que se ven en el campo y se recogen para su maduración y desarrollo (Figura 1); y nos referiremos a las semillas propiamente dichas cuando se obtienen los granos, más o menos duros, que se desprenden de las flores una vez han madurado (Figura 2).

Una información más detallada sobre las semillas, frutos y flores puede consultarse en Loques *et al.* (1988) y Talavera (2010).

Durante los años 2012 y 2013 se visitaron mensualmente las praderas naturales del País Vasco Oka, Lea y Bidasoa (Figura 3). En cada visita se empleó un máximo de media hora, buscando flores mediante observación directa en zonas densas de pradera.

### 2. Obtención de semillas

#### 2.1 Bancos de semillas

Una de las alternativas para la recolección de semillas de *Zostera noltei* es hacerlo directamente de las praderas marinas, pero el reducido tamaño de las semillas supone una gran dificultad. Por otro lado, si se espera a que estas semillas maduren y caigan al sedimento, su búsqueda se dificulta porque deberían identificarse y separarse de los elementos que

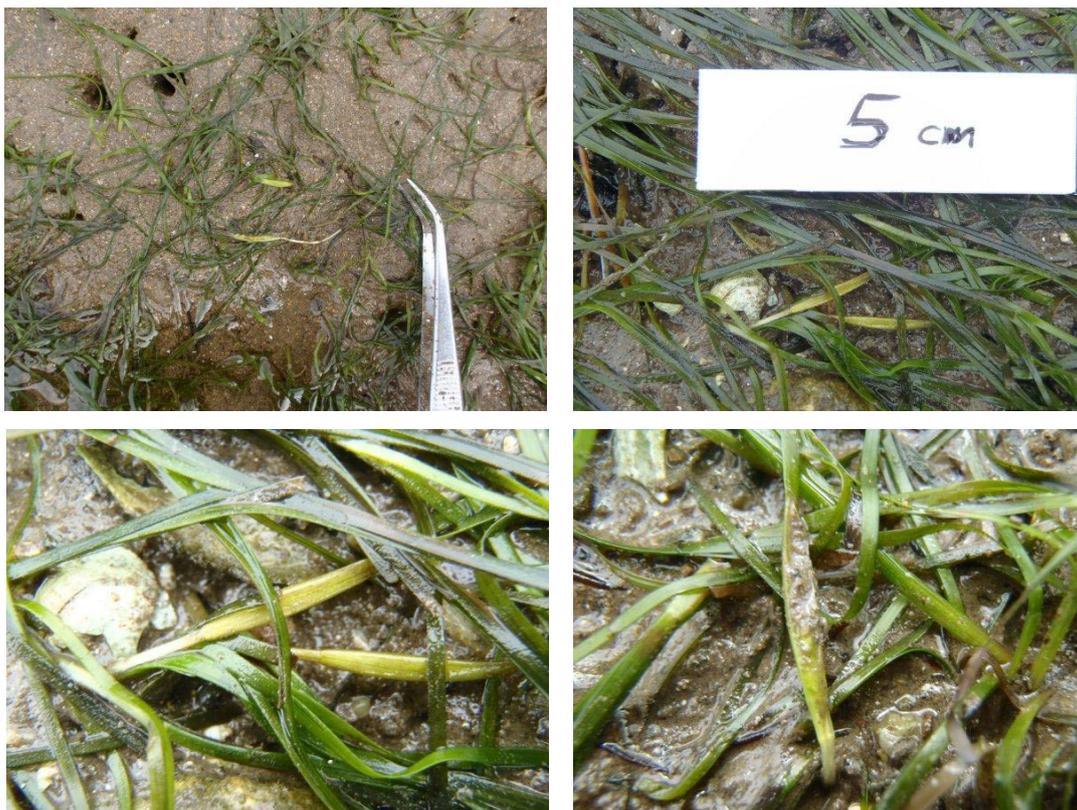


Figura 1. Flores de *Z. noltei* (junio 2012 en el estuario del Oka). Se aprecian las flores o espádices, que tienen un color verde más claro que las hojas no reproductoras.

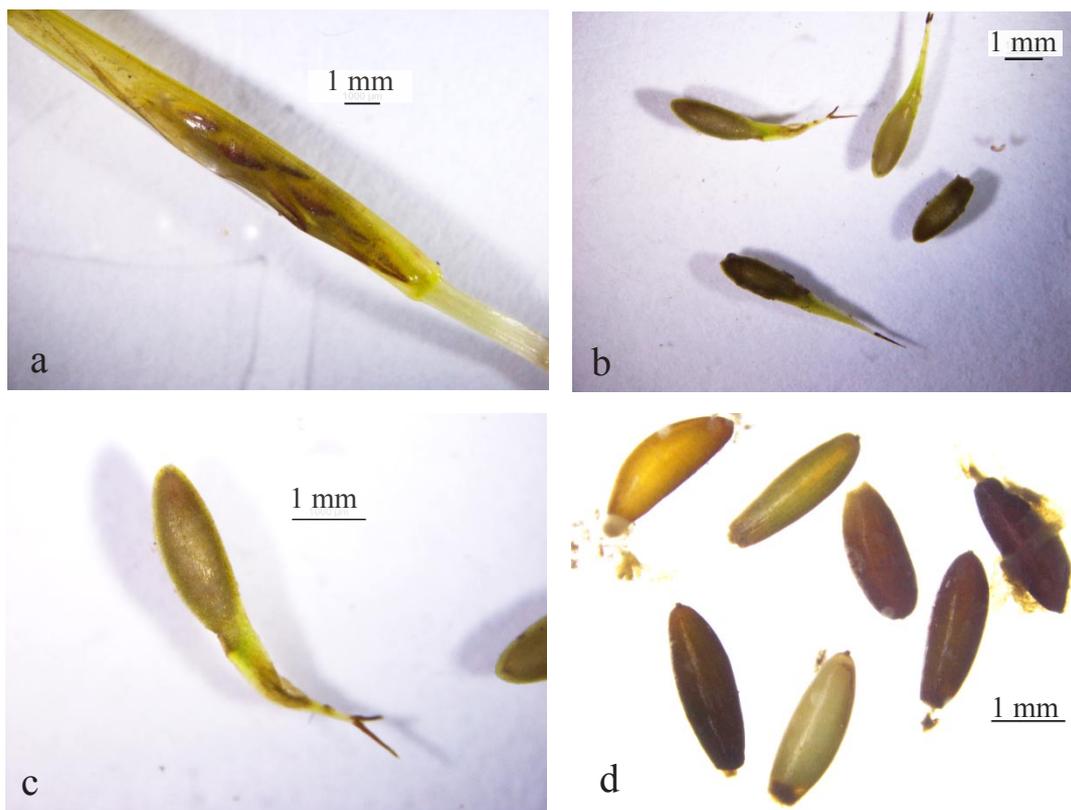


Figura 2. Flor (a) y semillas en distinta fase de desarrollo (b, c, d) recogidas en el estuario del Oka en septiembre de 2012.

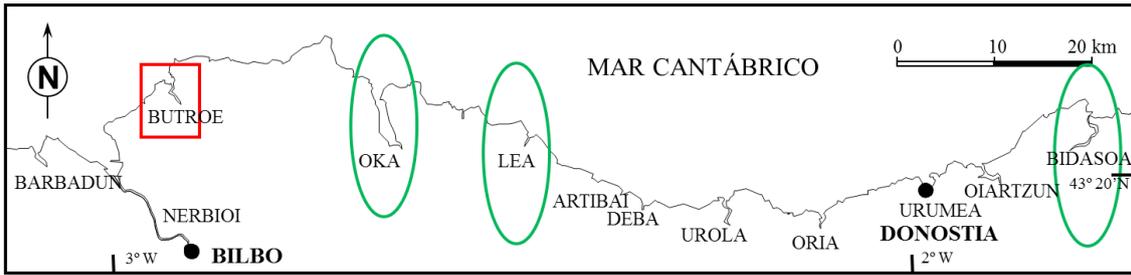


Figura 3. Estuarios del País Vasco: se resaltan (con elipse verde) los estuarios con praderas marinas naturales (Oka, Lea y Bidasoa) y (con rectángulo rojo) el estuario donde se están realizando pruebas de trasplante (Butroeo).

componen dicho sedimento (Hootsmans *et al.*, 1987; Loques *et al.*, 1990; Zipperle *et al.*, 2009). Otra opción es la recogida de las semillas directamente del sedimento en zonas conocidas como bancos de semillas (Hootsmans *et al.*, 1987; Peterken y Conacher, 1997; Greve *et al.*, 2005; Jarvis *et al.*, 2014), que son lugares donde se encuentran importantes acumulaciones de semillas producidas por las praderas marinas cercanas. En el caso de las praderas del País Vasco esta opción se ha descartado al no conocerse, de momento, ningún banco de semillas.

### 2.2 Maduración en laboratorio con aireación constante.

Otra alternativa más sencilla es la recolección de flores y la obtención de sus semillas en laboratorio. Para ello, en primer lugar se recogen las flores y se llevan al laboratorio, donde se colocan en un recipiente con agua marina, y se mantiene a unos 20 °C de temperatura, fotoperiodo natural y constante aireación del agua (adaptado de Alexandre *et al.*, 2006). De esta forma, se deja que las semillas vayan madurando (Figura 4). Según algunos autores debe mantenerse en estas condiciones durante unas tres semanas, tras los cuales se vacía el recipiente y se recogen las semillas formadas y separadas de las flores. Otra opción es revisar periódicamente estos recipientes y ver si las semillas se van soltando de las hojas. El proceso normal es que las semillas se vayan endureciendo y oscureciendo, las hojas se vayan pudriendo, y, al final, las semillas vayan saliendo de su envoltorio para quedar en el fondo del recipiente. Sea mediante la revisión y recolección continua de semillas, o bien mediante la recolección final tras un tiempo de espera, las semillas viables de las flores (en forma de granitos oscuros y duros) se quedan en el fondo del recipiente y son fácilmente distinguibles de los restos de hojas y flores. Se separan dichas semillas y se recogen en otro recipiente con agua marina y se disponen a 4 °C para su conservación.

A lo largo del año 2012, entre los meses de junio y noviembre, se recogieron flores del estuario del Bidasoa y del estuario del Oka (Figura 5) y se trató de obtener semillas siguiendo la metodología anteriormente expuesta. En diciembre de 2012 se recopilaban todas las semillas obtenidas, y tras su limpieza y selección se clasificaron en función de su color y origen. El distinto color de las semillas probablemente refleja su estado de desarrollo, presentando las semillas de color marrón oscuro una consistencia más dura y un mejor aspecto que el resto. Mientras tanto, las semillas se conservaron en oscuridad, a

4 °C, en pequeños botes de plástico, en agua de mar que se renovaba cada cierto tiempo.



Figura 4. Flores en recipiente con agua marina para el desarrollo y separación de las semillas.

### 2.3 Maduración en el medio natural.

Otra alternativa que parece aún más sencilla es la recolección de flores, su distribución dentro de bolsas de red y su colocación en el campo a la espera de la maduración de las semillas. Una vez maduras, las semillas caerán de las flores y traspasarán la red para llegar al sedimento, donde podrán germinar. Esta metodología combina dos fases: la maduración (y obtención) de semillas y su siembra (Pickerell *et al.*, 2005; Busch *et al.*, 2010; Golden *et al.*, 2010; Marion y Orth, 2010b).

Se han realizado experimentos con flores en campo. El objetivo principal es probar la metodología y comprobar su viabilidad. En caso de obtener un resultado positivo, sería un método fácil, cómodo y de bajo impacto sobre la población donante.

En agosto de 2012 se recogieron 200 flores en la población de Arketas (Oka). Al día siguiente se distribuyeron en dos bolsas con 100 flores cada una y se colocaron en una zona intermareal del estuario del Butroeo (Figura 5), potencialmente adecuada para el desarrollo de praderas marinas. Las bolsas se fijaron al sedimento mediante estacas de madera. Una de las bolsas quedó al descubierto, mientras que la otra se protegió con una caja de madera y una red para, por un lado, evitar la acción de los potenciales predadores de flores y semillas (anélidos,

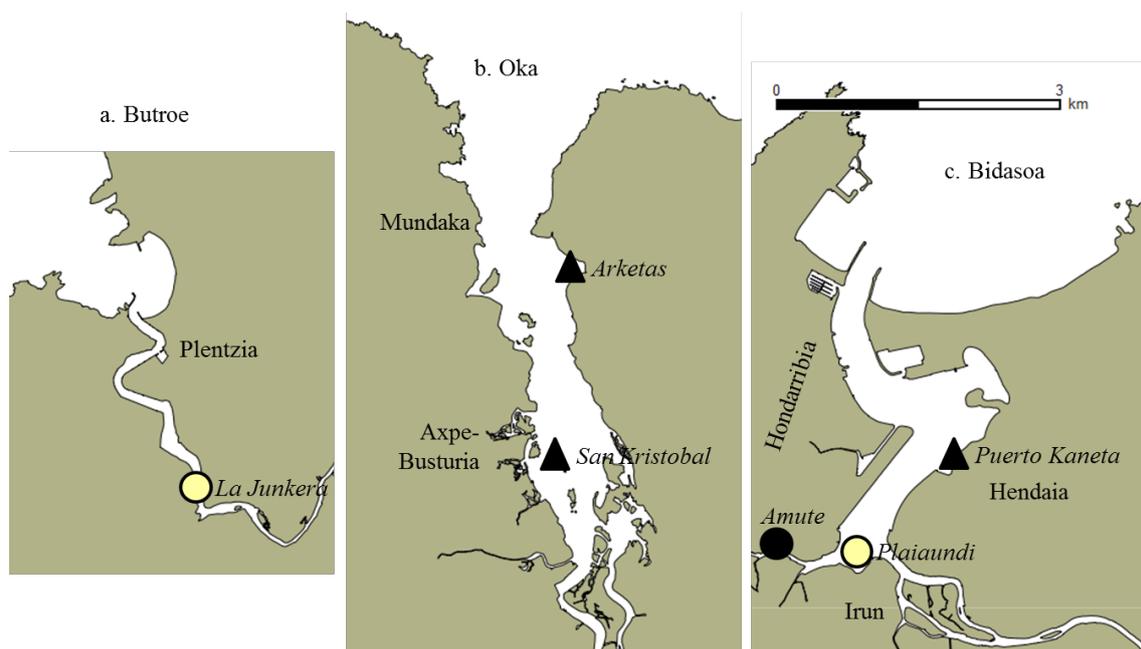


Figura 5. Estuarios que intervienen en las pruebas con semillas (**en gris**, la parte terrestre). Zonas de recolección de semillas (triángulo negro): Arketas y San Kristobal en el estuario del Oka y Puerto Kaneta en el estuario del Bidasoa; zonas de maduración y siembra de semillas (círculo amarillo): La Junkera en el estuario del Butroe y Plaiaundi en el estuario del Bidasoa; zona de siembra de semillas (círculo negro): Amute en el estuario del Bidasoa.

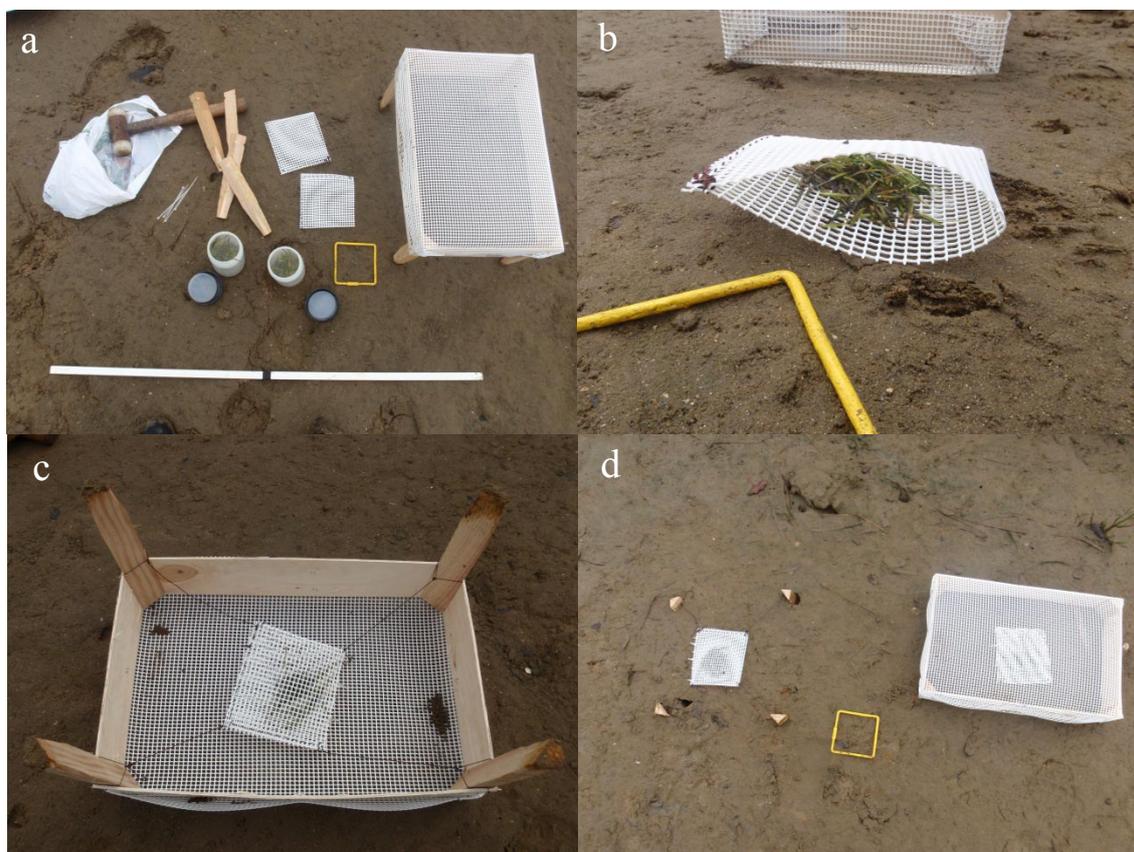


Figura 6. Material (a) utilizado en la colocación (b, c) de dos bolsas de red (d) con 100 flores cada una. Estuario del Butroe, agosto de 2012.

crustáceos y aves) y, por otro lado, evitar la llegada de semillas del exterior y garantizar que las plántulas que pudieran brotar procedan de las bolsas colocadas (Figura 6). De esta manera, se pretendía comprobar la necesidad de la protección de las bolsas de flores, para futuras pruebas. También en agosto, se repitió la misma actuación en Plaiaundi (estuario del Bidasoa) con flores recogidas en el Puerto Kaneta (estuario del Bidasoa).

Ante la duda de si las flores colocadas estaban ya fecundadas, o si pudieran serlo dentro de las bolsas, esta actuación se repitió en los meses de septiembre y octubre en los mismos lugares del estuario del Bidasoa (Tabla 1 y Figura 7) con la hipótesis de que cuanto más tarde se recojan las flores, la probabilidad de que éstas estén fecundadas será mayor. Si hubiera diferencias entre los meses, se podría confirmar esta hipótesis.

Fecha de muestreo	Origen flores	Destino flores
20/08/2012	Oka (Arketas)	Butroe (Plentzia)
25/08/2012	Bidasoa (P. Kaneta)	Bidasoa (Plaiaundi)
22/09/2012	Bidasoa (P. Kaneta)	Bidasoa (Plaiaundi)
19/10/2012	Bidasoa (P. Kaneta)	Bidasoa (Plaiaundi)

Tabla 1. Maduración en campo. Fecha de muestreo de flores, origen y destino de las flores. Se colocaron 2 bolsas de 100 flores en cada prueba (1 bolsa al descubierto y la otra protegida).

En noviembre de 2012 se vaciaron las bolsas colocadas en agosto en el Butroe: la bolsa desprotegida se encontraba semienterrada y llena de sedimento, mientras que la bolsa del interior de la caja se encontraba mezclada con material vegetal. La presencia de la caja parece haber contribuido a la erosión del sedimento en dicho punto (Figura 8). Se vaciaron las bolsas en sus puntos correspondientes y se dejaron las estacas y la caja (sin cubrir) para servir de referencia en el seguimiento de los próximos meses.

En el mismo mes (noviembre de 2012) también se visitó Plaiaundi (estuario del Bidasoa) para vaciar las bolsas (Figura 9). No se encontró ninguna flor en ninguna de las bolsas colocadas en agosto, septiembre y octubre, y se quitaron

todas las bolsas; en el caso de que tuvieran algún contenido (sedimento o material vegetal) éste se vació en el mismo punto, y las cajas volvieron a cubrirse con la red. En febrero de 2013 se quitaron las cajas.

### 3. Germinación y siembra de semillas

Con el objeto de responder a cuestiones tales como la viabilidad de las semillas recogidas (en conjunto, en función de su color o grado de desarrollo y de posibles tratamientos previos a la siembra), se plantearon unos experimentos que consistieron en pruebas de germinación en laboratorio y siembras de semillas (germinadas y sin germinar) en el medio natural.

Para el primer experimento de viabilidad se utilizaron 60 semillas de dos estuarios (30 del estuario del Oka y 30 del estuario del Bidasoa) y con distinto grado de desarrollo: 10 blancas, 10 verde/marrón claro y 10 marrón oscuro.

Tomando como referencia los trabajos de Loques *et al.* (1990) y Alexandre *et al.* (2006) se diseñó el siguiente experimento de laboratorio: se mantuvieron 10 semillas de cada tipo (3 colores) en recipientes individualizados con agua en condiciones controladas (salinidad 1, temperatura 22 °C, fotoperiodo 12/12 h luz/oscuridad) hasta su germinación (Figura 10). Este experimento comenzó el 20 de febrero y finalizó el 3 de mayo de 2013, a los 72 días.

Cada día se observaron estas semillas y se registró el número de germinaciones. Una semilla era considerada germinada cuando presentaba un corte longitudinal por donde comenzaba a emerger el cotiledón (Figura 11).

Coincidiendo con el inicio del experimento, en los estuarios del Butroe (14 de febrero) y del Bidasoa (16 de febrero) se plantaron 10 semillas sin germinar de cada color (enterradas a 0,5 cm de profundidad). Para protegerlas y asegurar que no fueran arrastradas por la corriente, la zona se rodeó con una caja con la parte superior cubierta por una red (Figura 12).

Además, las semillas germinadas en laboratorio fueron posteriormente plantadas en el campo, protegiéndose con una caja (Figura 13): 8 semillas en el estuario del Bidasoa (9 de marzo) y 13 semillas en el estuario del Butroe (11 de marzo).

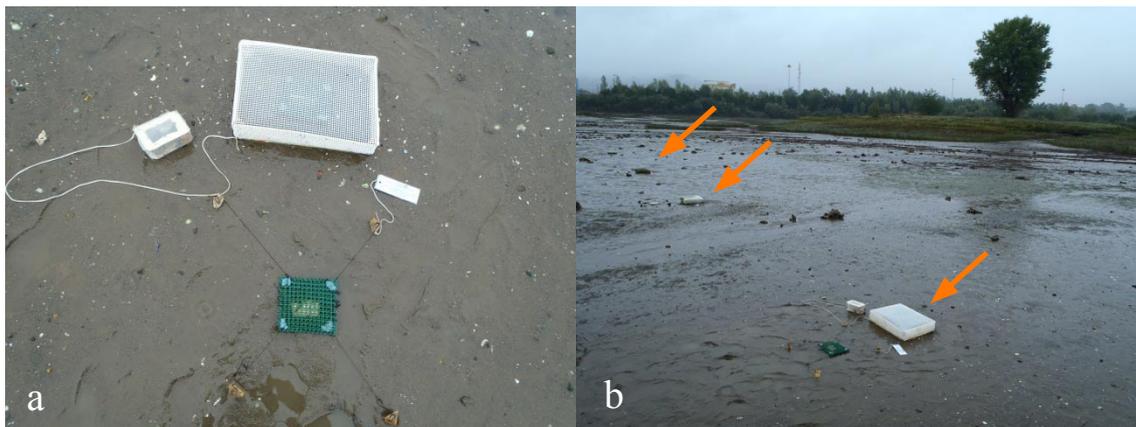


Figura 7. Estuario del Bidasoa (Plaiaundi), octubre de 2012. Bolsas con flores colocadas en octubre; (a). Las flechas naranjas indican las cajas colocadas en los tres meses (agosto, septiembre, octubre). (b)



Figura 8. Estuario del Butroe, noviembre de 2012. Aspecto de las bolsas/caja antes (a, b, c) y después (d) del vaciado de las bolsas.

Las semillas plantadas en el estuario del Butroe procedieron siempre del estuario del Oka (Axpe y Arketas), mientras que las plantadas en Plaiaundi (Bidasoa) procedieron de Puerto Kaneta (Bidasoa).

Con el mismo fundamento se realizó otra prueba: en octubre de 2014 se recogieron flores en Puerto Kaneta (Bidasoa) y se mantuvieron durante dos semanas en laboratorio en recipientes con agua marina y aireación constante para la obtención de las semillas. La mitad de las semillas se trasvasó a un recipiente con agua dulce para facilitar su germinación. A mediados de noviembre se plantaron 600 semillas en la zona de Amute, en el estuario del Bidasoa: por un lado se enterraron 300 semillas sin germinar (en una superficie de 20 x 30 cm y a una profundidad de 0,5 cm); y por otro lado, a una distancia de 2 m, se enterraron en las mismas condiciones otras 300 semillas que previamente habían sido tratadas para su germinación. No hay constancia de que en esta zona hubiera existido previamente *Zostera noltei* y, en la actualidad, el ejemplar más cercano se encuentra a unos 600 m río abajo.

#### 4. Obtención de plántulas en laboratorio

A partir de semillas en el mismo estado o mismo color (marrón oscuras), se pretende conocer las condiciones de laboratorio más aptas para el desarrollo de estas semillas hasta

plántulas. La hipótesis asumida de partida es que las semillas oscuras son las más maduras y, por consiguiente, las de mayor viabilidad.

Se realizaron experimentos con 180 semillas oscuras procedentes de dos estuarios (90 del estuario del Oka y 90 del Bidasoa).

Basado en trabajos precedentes (Loques *et al.*, 1990; Brechley y Probert, 1998; Alexandre *et al.*, 2006) y se diseñó el siguiente experimento de laboratorio: en primer lugar, germinar de cada estuario 90 semillas oscuras distribuidas en 5 recipientes con agua en condiciones controladas (salinidad 1, temperatura 22 °C, fotoperiodo 12/12 h luz/oscuridad); posteriormente, colocar las 90 semillas germinadas de cada estuario en grupos de 10 (3 réplicas) a 3 salinidades diferentes: 30 a 10, 30 a 20 y 30 a 30, y todas ellas a 20 °C, con fotoperiodo “natural” (12/12 h luz/oscuridad) y con aireación durante 60 días.

A medida que se van obteniendo plántulas (hojas verdes), se pasan a botes con sedimento y a la misma salinidad, para que se vayan fijando al sustrato. Una vez obtenidas plántulas bien formadas, se sembrarían en el campo junto con un número similar (p. ej. 10) de semillas sin germinar y otras tantas germinadas: enterrarlas todas ellas a 0,5 cm de la superficie, protegidas por cajas de madera. El experimento finalizaría con el seguimiento posterior del desarrollo del material plantado

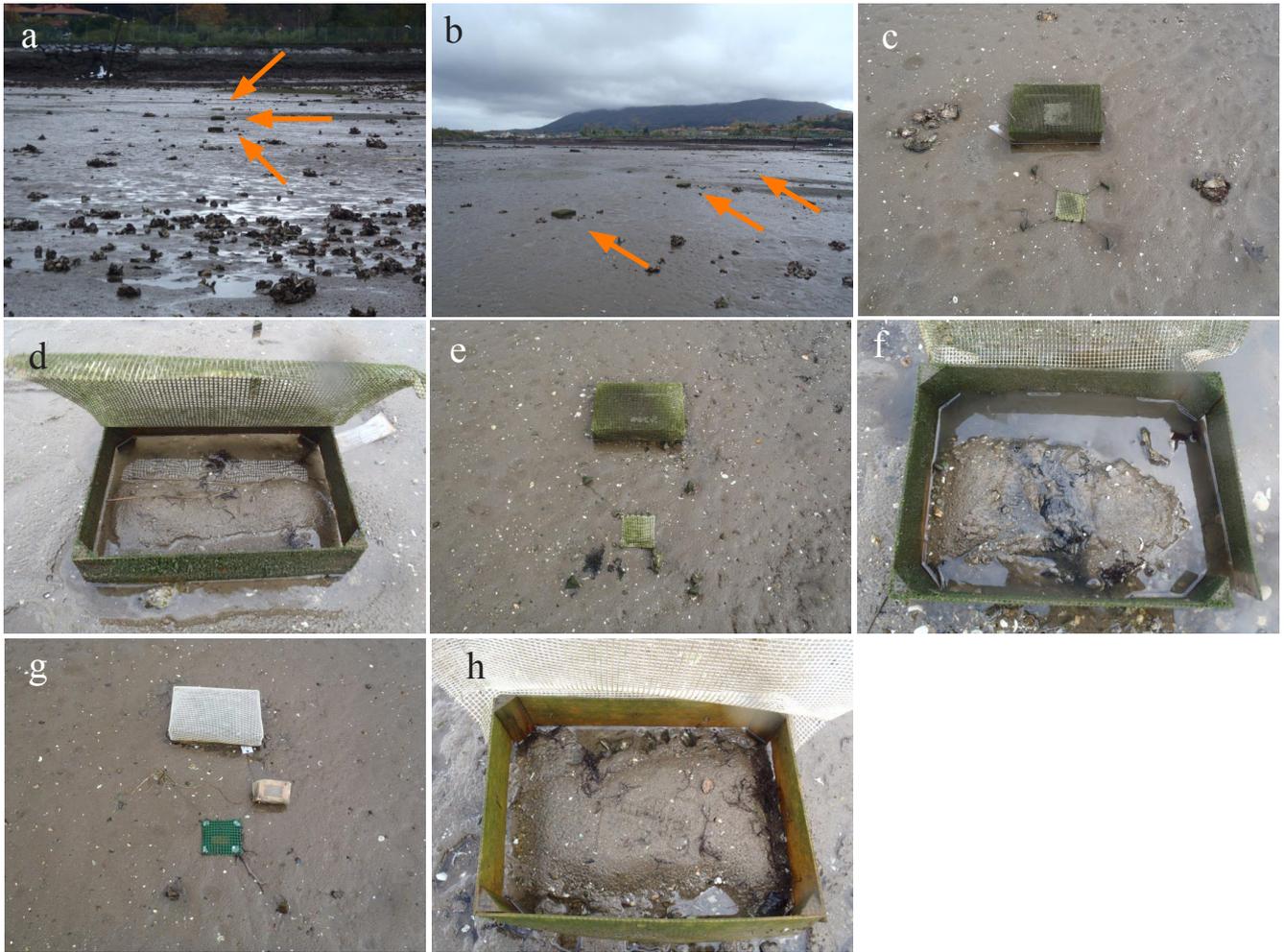


Figura 9. Estuario del Bidasoa (Plaiiaundi), noviembre de 2012. Se observan las tres cajas alineadas en la marisma (flechas naranjas en a y b), y el aspecto de las bolsas-cajas e interior de la caja una vez extraída la bolsa (c y d-Bolsa/caja colocada en agosto; e y f-Bolsa/caja colocada en septiembre; g y h-Bolsa/caja colocada en octubre).

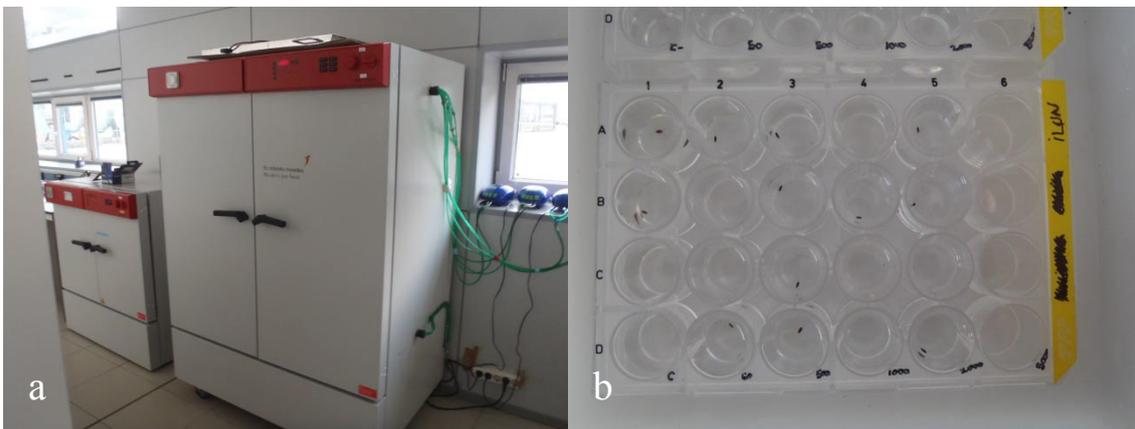


Figura 10. Cámara incubadora (a) para controlar las condiciones de crecimiento y semillas distribuidas en pocillos individualizados (b).

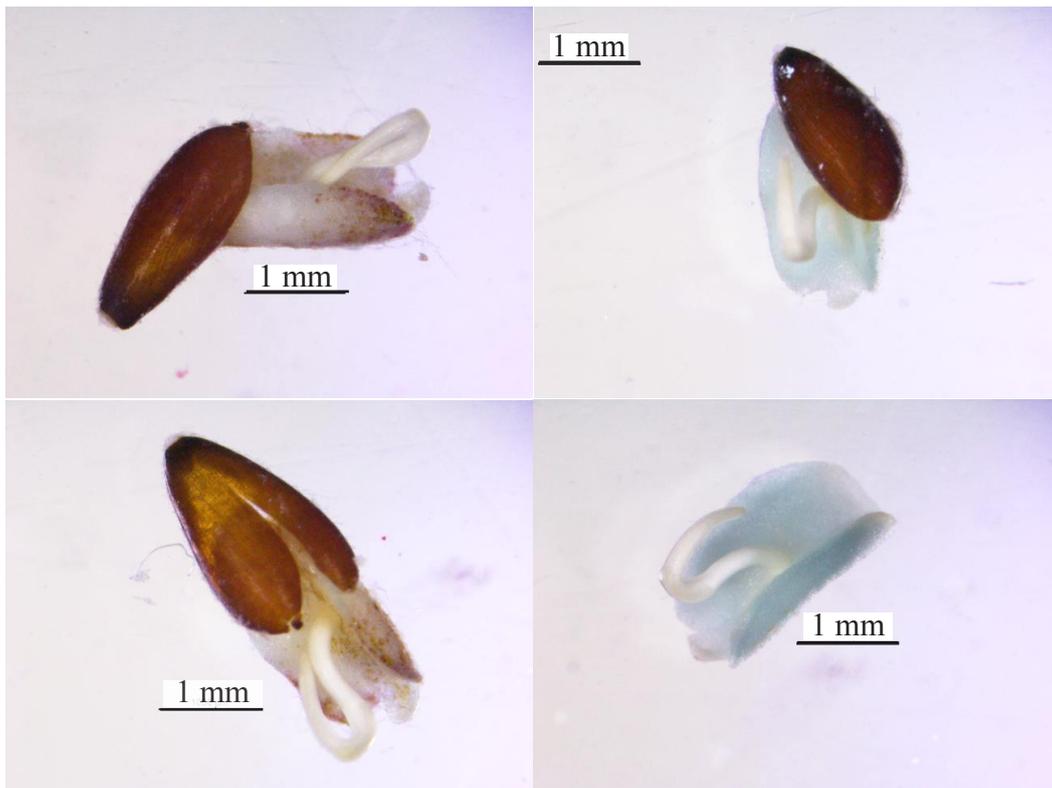


Figura 11. Semillas germinadas. Se observa el corte longitudinal generado de manera espontánea y la emersión del cotiledón.



Figura 12. Plantación de 10 semillas de cada color, separadas por tablillas de madera y protegidas por una caja con red. Estuario del Bidasoa, febrero de 2013.



Figura 13. Plantación de las semillas germinadas en laboratorio y protegidas por una caja con red. Estuario del Butroe, marzo de 2013.

mediante visitas periódicas mensuales.

Este experimento comenzó el 20 de febrero y acabó el 3 de mayo de 2013. Cada día se observaban las semillas para:

- a medida que iban germinando, formar grupos (réplicas) de 8 y pasarlas a los recipientes de distintas salinidades.
- registrar su desarrollo en cada una de las salinidades.

## Resultados y Discusión

### 1. Fenología reproductora de *Zostera noltei*

Se encontraron flores en las tres poblaciones naturales del País Vasco (Oka, Lea y Bidasoa) entre junio y noviembre de 2012 y entre mayo y octubre de 2013 (Tabla 2). El periodo de presencia de flores coincidió con lo encontrado por otros autores: en Holanda, Hootsmans *et al.* (1987) las encuentran entre junio y septiembre; en Portugal, Alexandre *et al.* (2006)

las encuentran entre marzo y noviembre; en Alemania, Zipperle *et al.* (2009) las encuentran entre junio y octubre.

A pesar de que en cada época dominaban las flores en un estado de desarrollo concreto, en una misma época se pudieron observar flores en distintas fases: flores cerradas, abiertas con inflorescencias macho maduras, abiertas con inflorescencias hembra maduras, con semillas bastante desarrolladas... Al principio de este periodo de presencia de flores se encontraron fundamentalmente flores tempranas y cerradas. La mayor cantidad de flores abiertas se vieron en agosto-septiembre, mientras que en octubre-noviembre la cantidad de flores había disminuido. No obstante, en los últimos meses de cada año, la mayoría de las flores presentaban semillas bastante desarrollados (Figura 14).

Las praderas de estos estuarios pueden encontrarse ocupando superficies relativamente amplias o en formaciones pequeñas más o menos circulares de distinto tamaño (con diámetro de

Año	Mes	Oka		Bidasoa		Lea
		Arketas	S.Kristobal	Plaiiaundi	P.Kaneta	
2012	Enero	-				
	Febrero	-				
	Marzo					
	Abril	-	-			
	Mayo	-				
	Junio		+	+	+	
	Julio	+	+			
	Agosto	+	+	+	+	
	Septiembre	+	+		+	+
	Octubre	+			+	
	Noviembre	+	+		+	
	Diciembre	-			-	
2013	Enero	-				
	Febrero	-				
	Marzo	-	-			
	Abril					
	Mayo		+	-		
	Junio			+		
	Julio		+			
	Agosto		+	+		
	Septiembre		+			
	Octubre		+	+		
	Noviembre			-		
	Diciembre		-			

Tabla 2. Presencia (+) y ausencia (-) de flores de *Zostera noltei* en campo en los años 2012 y 2013. Las celdas sombreadas representan meses muestreados y las celdas vacías ausencia de muestreo.



Figura 14. Flores recogidas en el estuario del Bidasoa (Puerto Kaneta) el 19 de octubre de 2012, donde se observan las semillas bastante desarrolladas.

0,5-3 m).

Además, también se vieron flores en unidades trasplantadas: en julio de 2012 en el estuario del Oka, en plantas trasplantadas en 2010 procedentes de otra zona del Oka; y en agosto de 2012 en el estuario del Butroe, en plantas trasplantadas en 2011 procedentes del Oka. Esto indica que las unidades trasplantadas tienen la capacidad de producir flores.

### 2. Obtención de semillas

La maduración en laboratorio ha ofrecido resultados dispares (Tabla 3). En los primeros intentos no se han obtenido semillas, quizás por haber utilizado una temperatura demasiado baja, o quizás por haberlos realizado en una fecha demasiado temprana, cuando los óvulos aún no se encontraban fecundados. Sin embargo, en las pruebas más tardías, especialmente las correspondientes a los muestreos de noviembre, se han podido obtener bastantes semillas (Figura 15).

En cuanto a las pruebas de maduración en campo, a lo largo de los años 2013 y 2014 se visitaron las zonas donde fueron

colocadas las bolsas de maduración en agosto-octubre de 2012. En las diferentes visitas realizadas al Bidasoa se observaron marcas de pisadas de aves en las cercanías y pequeñas roturas en la red de protección de las cajas, probablemente producidas por picotazos de aves, pero no se observó ninguna semilla ni plántula. Por tanto, las pruebas no han dado resultados positivos, bien porque la metodología empleada no ha sido la adecuada, bien porque las zonas de destino seleccionadas no han sido las adecuadas, bien porque no se ha utilizado un número suficientemente elevado de flores/semillas, o por alguna otra razón que no ha sido contemplada.

### 3. Época de recolección de semillas

Existen algunos trabajos donde se ofrecen resultados de recogida de flores o recogida directa de semillas (Hootsmans *et al.*, 1987; Loques *et al.*, 1988, 1990; van Katwijk *et al.*, 2004; Alexandre *et al.*, 2006; Zipperle *et al.*, 2009). Sin embargo, para el caso de las praderas marinas vascas, debemos partir de los muestreos realizados para los objetivos comentados en

Fecha de muestreo	Lugar de muestreo	nº flores recogidas	nº semillas obtenidas tras maduración en laboratorio	Temperatura laboratorio	Tiempo en laboratorio (semanas)
06/06/2012	Oka (San Kristobal)	aprox. 100	0	15 °C	4
09/06/2012	Bidasoa (P. Kaneta)	aprox. 100	0	15 °C	4
06/09/2012	Oka (San Kristobal)	aprox. 25	7	20-25 °C	3
22/09/2012	Bidasoa (P. Kaneta)	aprox. 100	10	20-25 °C	3
17/10/2012	Oka (Arketas)	aprox. 100	39	≈20 °C	3,5
19/10/2012	Bidasoa (P. Kaneta)	aprox. 100	29	≈20 °C	3,5
01/11/2012	Bidasoa (P. Kaneta)	370	191	≈20 °C	3
14/11/2012	Oka (San Kristobal)	aprox 500	161	≈20 °C	3
15/11/2012	Oka (Arketas)	aprox. 100	9	≈20 °C	3
17/11/2012	Bidasoa (P. Kaneta)	aprox. 100	44	≈20 °C	3

Tabla 3. Maduración de semillas en laboratorio. Se indica la fecha y lugar de muestreo de flores, el número de flores recogidas en campo y el número de semillas recogidas tras mantenimiento en laboratorio, así como la temperatura y el tiempo.

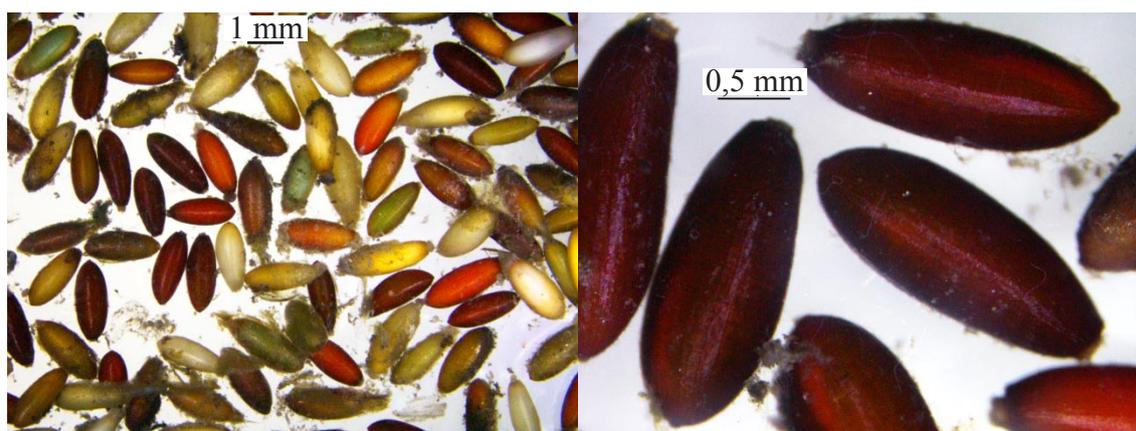


Figura 15. Semillas de *Zostera noltei* de distinto color obtenidas tras mantenimiento en laboratorio de flores procedentes de los estuario del Oka y del Bidasoa.

apartados anteriores.

La Tabla 2 nos indica que se pueden recoger flores (por tanto, potenciales semillas) entre junio y noviembre. Por otro lado, la Tabla 3 nos indica que, dentro de este periodo, la etapa más tardía ofrece mayores garantías de obtención de semillas, ya que las flores han tenido más tiempo para llevar a cabo la fecundación necesaria para la formación de las semillas y, además, estas han podido mantenerse durante un mayor tiempo en su medio natural, lo cual les ha permitido disfrutar de las condiciones más adecuadas para su normal y completo desarrollo. Sin embargo, en este periodo su visibilidad disminuye: hay una mayor dificultad de identificación de las flores, ya que disminuyen su tamaño porque pierden parte de su hoja, toman un color marrón que las confunde con el color del sedimento y su entorno, y en muchos casos aparecen semienterradas. A pesar de ello, la mejor época de recogida de semillas (o, mejor dicho, flores con semillas) en las praderas marinas vascas es octubre-noviembre.

#### 4. Germinación y siembra de semillas

Tal y como se observa en la Tabla 4, el experimento de la germinación duró 72 días. En todo el conjunto del experimento germinaron 4 semillas blancas (20%); 9 marrón claras (45%); y 12 marrón oscuras (60%).

De 30 semillas procedentes de cada estuario, germinaron 10 del estuario del Bidasoa y 15 del Oka.

La mayor cantidad de semillas germinaron dentro de la primera semana: 8 de 10 en el estuario del Bidasoa y 11 de 15 en el Oka.

En principio se pretendía comprobar la viabilidad de todas las semillas mediante su germinación y, con aquellas que no hubieran germinado, mediante el test del tetrazolio (Conacher *et al.*, 1994; Dooley *et al.*, 2013). En este test, al colocar una semilla viable en contacto con una solución de tetrazolio, los tejidos del embrión adquieren un color rojo intenso; mientras

que si la semilla no es viable, el embrión no cambia de color. Sin embargo, no se pudo llevar a cabo el segundo método debido a que todas las semillas que no germinaron desarrollaron unos pelillos, con apariencia de micelio, lo cual fue interpretado como una infección de algún “hongo” (Figura 16). Una vez infectada, los pelillos se hacían cada vez más abundantes y la semilla no mostraba signos de desarrollo. Además, estos hongos también aparecieron en algunas de las semillas germinadas.

A partir de las semillas de distinto color, con estas pruebas se pretende saber si el color (grado de desarrollo) influye en el éxito de germinación. La hipótesis de partida es que el color de las semillas (grado de maduración) influye en el porcentaje de germinación. El interés que tiene esta prueba es optimizar la recolección para la siembra de semillas.

De los resultados que se ofrecen más arriba se deduce que las semillas de color marrón oscuro tuvieron una mayor viabilidad (60%), seguidas de las marrón claras (45%) y, finalmente, las blancas (20%).

Considerando no viables las semillas infectadas por el “hongo”, la viabilidad observada en las semillas marrón oscuras del País Vasco (60%) se encuentra en el mismo rango de variación de las mencionadas para praderas de Portugal (70%, en Alexandre *et al.*, 2006) y Mediterráneo francés (72%, en Loques *et al.*, 1990).

Además de una elevada viabilidad, las semillas de los estuarios vascos presentaron una rápida germinación: el 45% de las semillas marrón claras y el 40% de las marrón oscuras habían germinado para el día 15, mientras que Alexandre *et al.* (2006) obtienen el 70% de germinación para el día 26, y Loques *et al.* (1990) el 42% para el día 63.

Todas estas semillas que se plantaron tanto en La Junkera (estuario del Butroe) como en Plaiaundi (estuario del Bidasoa) no ofrecieron resultados positivos, ya que tras el seguimiento posterior durante los años 2013 y 2014 no se vió ninguna planta en las zonas de plantación.

Origen	Día n°	Número de semillas germinadas			Porcentaje acumulado de semillas germinadas		
		Blanca	Marrón clara	Marrón oscura	Blanca	Marrón clara	Marrón oscura
Bidasoa (B)	1	1			10		
	2			1			10
	5		2	1		20	20
	7	3			40		
	49			1			30
	63 a 68			1			40
	63 a 72				40	20	40
Oka (O)	1			2			20
	2		2			20	
	5		3	2		50	40
	7		1	1		60	50
	9		1			70	
	15			1			60
	35 a 47			2			80
	50 a 72				0	70	80

Tabla 4. Experimento de germinación de semillas blancas, marrón claras y marrón oscuras. Número, porcentaje y porcentaje acumulado de semillas germinadas y día de germinación. Semillas procedentes del estuario del Bidasoa y del Oka. Inicio del experimento con 10 semillas de cada color.

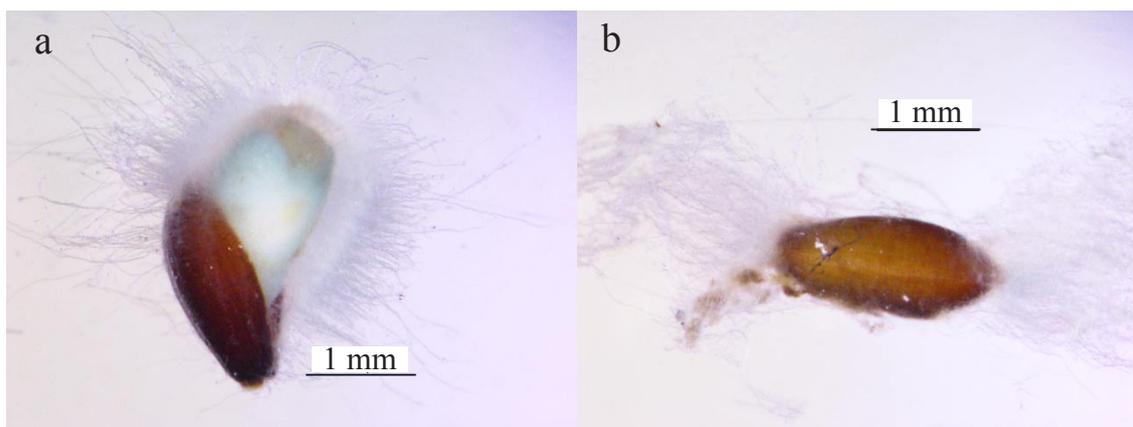


Figura 16. Semillas germinadas del estuario del Bidasoa, afectadas por el “hongo” en el día 4.



Figura 17. Plantas originadas a partir de 300 semillas germinadas (a) y sin germinar (b) en un plazo de 8 meses en Amute (estuario del Bidasoa).

Sin embargo, la segunda prueba de plantación realizada en Amute (estuario del Bidasoa) sí dio un resultado positivo: en agosto de 2015 (8 meses tras la siembra) se encontraron plantas tanto en la zona de las 300 semillas germinadas como en la zona de las 300 semillas sin germinar (Figura 17). Los haces encontrados ocupaban una superficie de 435 cm<sup>2</sup> en la primera zona (Figura 17a) y 770 cm<sup>2</sup> en la segunda (Figura 17b). Si bien es cierto que no se aislaron las zonas de siembra pudiendo permitir la llegada de plantas por el agua, es altamente improbable que hubiera sucedido: resulta muy difícil que, de todo el espacio adecuado para el asentamiento de las praderas en esta zona interior del estuario del Bidasoa, semillas o plantas procedentes de otras praderas del estuario fueran a establecerse precisamente en las pequeñas zonas (600 cm<sup>2</sup>) donde se colocaron las semillas y, además, lo hicieran coincidiendo con el periodo del experimento, cuando no se tiene constancia de su presencia en esta zona en años precedentes.

Por tanto, a pesar de que las primeras pruebas no resultaron positivas, quizás debido al bajo número de semillas empleado, los resultados de la segunda prueba demuestran la viabilidad de estas semillas y su capacidad de desarrollarse en plantas bien formadas en un espacio de tiempo relativamente corto. Por otro lado, parece que el hecho de plantar semillas ya germinadas no aporta ninguna mejora; al contrario, en este caso las semillas sin germinar han producido un mayor número de haces (Figura

17b) al menos en esta primera observación. Este resultado anima a seguir trabajando en la misma línea y a diseñar nuevos experimentos con semillas.

##### 5. Obtención de plántulas en laboratorio

Tal y como se observa en la Figura 18, a los 72 días habían germinado 134 semillas en el conjunto de ambos estuarios, es decir, el 74,4%. Los primeros días fueron muy activos en cuanto a la germinación de las semillas: para el día 7 ya habían germinado 87 semillas (48,3%); para el día 16 lo habían hecho 110 (61,1%); y para el día 30 lo habían hecho 126 (70,0%).

Tal y como se ha comentado en el experimento anterior, se pretendía comprobar la viabilidad de aquellas semillas que no hubieran germinado mediante el test del Tetrazolio. Sin embargo, no se pudo llevar a cabo el segundo método debido a que la mayoría de las semillas que no germinaron desarrollaron unos pelillos semejantes a un “hongo” (Figura 19). Ya en el segundo día algunas semillas se encontraban infectadas, especialmente las del estuario del Bidasoa. Por precaución, cuando se veían semillas infectadas, eran separadas en otro bote y se cambiaba el agua para prevenir la infección del resto. El 26 de marzo, a los 34 días, se retiraron todas las semillas con hongos y las blandas: del estuario del Bidasoa se eliminaron 37 y quedaron 8, mientras que del estuario del Oka se retiraron 13 y quedaron 4.

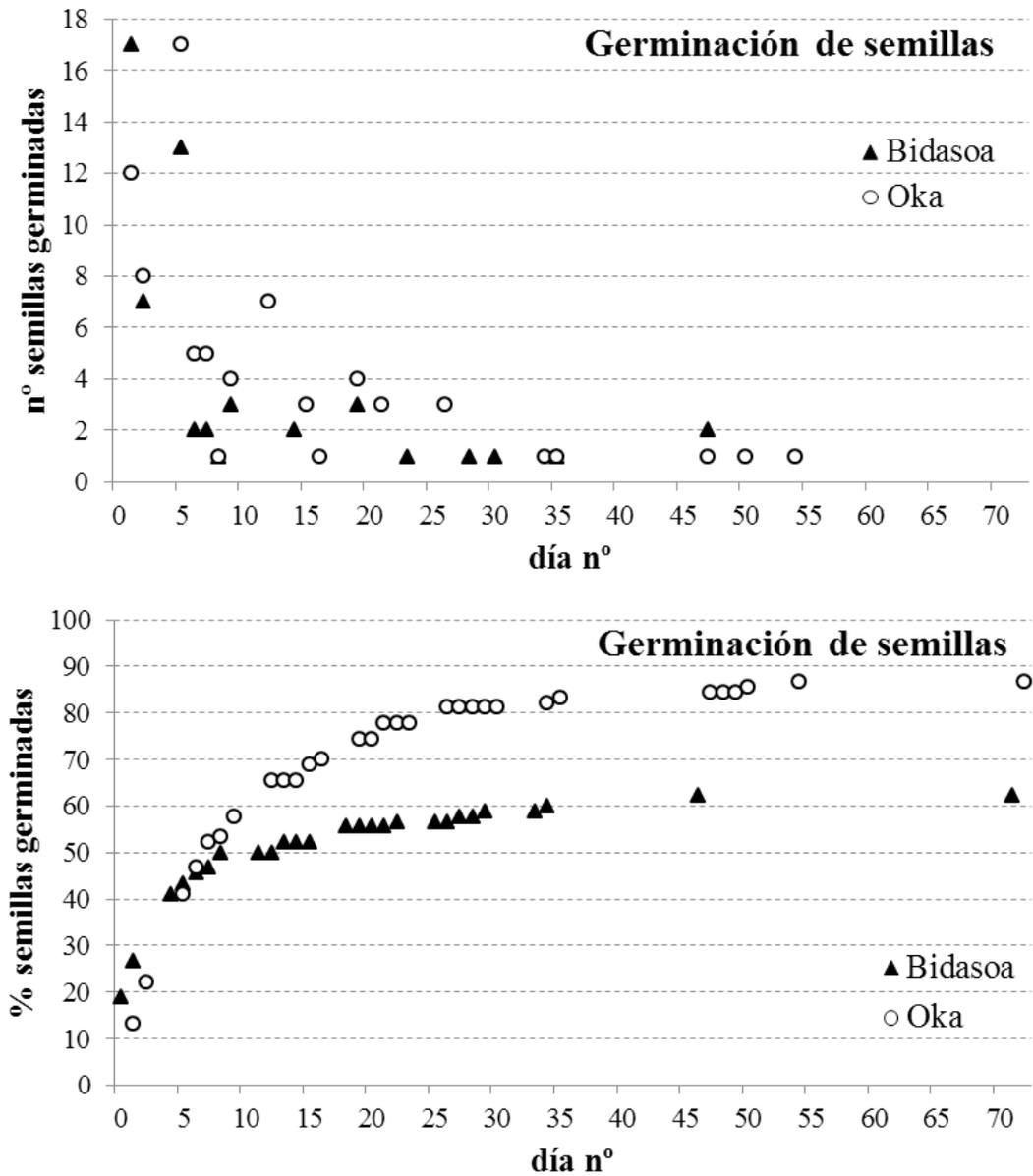


Figura 18. Germinación de semillas oscuras del Bidasoa y del Oka. Número de semillas germinadas cada día (arriba) y porcentaje acumulado (abajo). Inicio con 90 semillas de cada estuario.

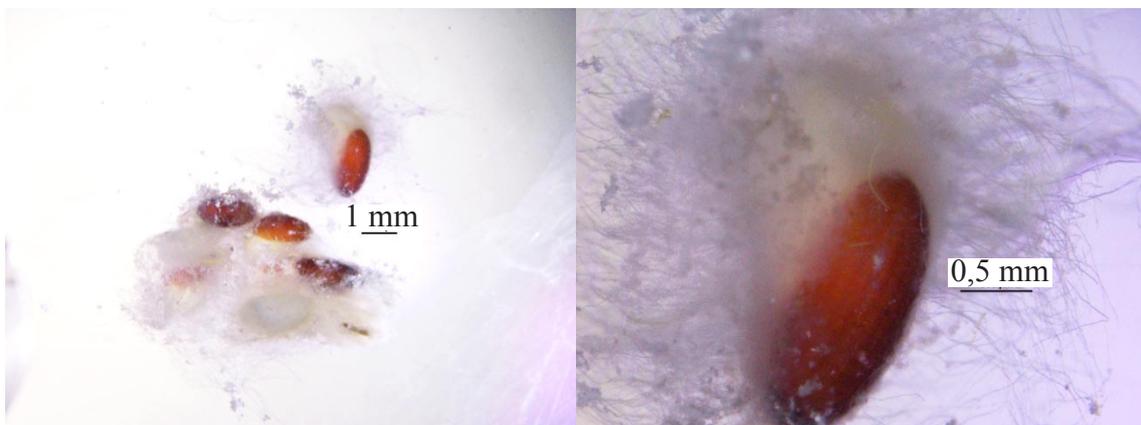


Figura 19. Semillas germinadas del estuario del Bidasoa, afectadas por el “hongo” en el día 4.

	Desarrollo semillas en vasos con agua y aireación			
	nº semillas	salinidad	Réplica	Inicio
Bidasoa	8	10	B10a (ch)	28-feb
	8	10	B10b (ch)	04-mar
	8	10		
	8	20	B20a (ch)	28-feb
	8	20	B20b (ch)	28-feb
	8	20		
	8	30	B30a (ch)	28-feb
	8	30	B30b (ch)	28-feb
	8	30		
Oka	8	10	O10a (sh)	28-feb
	8	10	O10b (ch)	28-feb
	8	10		
	8	20	O20a (ch)	28-feb
	8	20	O20b (ch)	28-feb
	8	20	O20c (6 ch, 2 sh)	13-mar
	8	30	O30a (ch)	28-feb
	8	30	O30b (ch)	04-mar
	8	30	O30c (2 ch, 6 sh)	08-mar

Tabla 5. Experimento de obtención de plántulas a distintas salinidades a partir de semillas germinadas procedentes de los estuarios del Bidasoa y del Oka. Réplica: ch, semillas con hongos; sh, semillas sin hongos. Inicio: fecha de formación de la réplica.

A medida que las semillas iban germinando, se fueron completando réplicas de 8 semillas y se introducían en botes con agua a distinta salinidad. En la Tabla 5 se muestran las réplicas conseguidas y las fechas de formación de cada réplica. Al principio, las semillas obtenidas estaban sin infectar, pero éstas se iban infectando mientras se esperaba a la obtención del número mínimo para formar una réplica. Por eso, hay algunas réplicas formadas por semillas con hongos, otras con semillas sin hongos y otras mixtas. A pesar de esta heterogeneidad, todas estas réplicas se mantuvieron 72 días, hasta el 3 de mayo, pero ninguna de estas semillas siguió desarrollándose para formar una plántula, por lo que se decidió interrumpir el experimento.

No obstante, a pesar de que no se pudo alcanzar el objetivo inicial, los resultados obtenidos en la germinación de las semillas (Figura 18) pueden ser útiles y compararse con los resultados de la Tabla 4 correspondientes al primer experimento de germinación (apartado 4. *Germinación y siembra de semillas* del presente artículo): la germinación observada en el paso previo de este apartado 5 ha sido mayor que el obtenido en el primer experimento (apartado 4), pasando el porcentaje de semillas germinadas del 60% al 74,4%. De esta manera, los porcentajes se acercan y superan los 70-72% señalados en la bibliografía (Loques *et al.*, 1990; Alexandre *et al.*, 2006).

En cuanto al tiempo de germinación, en este segundo experimento se han acelerado los tiempos, registrándose para el día 15 el 60,5% de semillas germinadas en el conjunto de ambos estuarios (Oka y Bidasoa), cuando en el primer experimento y en el mismo plazo de tiempo se obtuvieron el 40%. Para el día 26, cuando Alexandre *et al.* (2006) obtienen el 70% de semillas germinadas, en los estuarios vascos se observa

el 69%. Por tanto, en esta segunda prueba, los resultados de viabilidad inicial de las semillas, entendiéndose ésta como su capacidad de germinación, han aumentado claramente.

Sin embargo, los resultados de viabilidad de las semillas vascas en general, han podido verse afectados de manera negativa por la infección del “hongo”: aquellas semillas que no han germinado a causa de la infección del hongo han sido consideradas inviables cuando quizás no lo fueran.

## Conclusiones

En el transcurso del presente trabajo se han obtenido las siguientes conclusiones:

- Se han encontrado flores de *Zostera noltei* en las praderas marinas de los estuarios vascos entre junio y noviembre (ambos inclusive).

- Teniendo en cuenta las fases de desarrollo de las flores y frutos, los meses que en 2012-2013 han presentado una mayor garantía para una buena **recolección de semillas** han sido **octubre y noviembre**.

- En lo referente a los **ensayos de germinación de semillas**:

- La **tasa de germinación** de las semillas de los estuarios vascos es **elevada** (74,4%), similar a las de otras poblaciones europeas. Además, estas semillas presentan una **rápida germinación**: en 7 días han germinado el 49% de las semillas; en 16 días el 61%. Posteriormente la tasa se ralentiza mucho. Algunas semillas se han visto afectadas por el desarrollo de un posible *hongo* no identificado.

- Las **semillas sembradas** en campo (Bidasoa y

Butroe) han producido **nuevas plantas**.

- **No** se han podido obtener **plántulas** mediante germinación de semillas **en laboratorio**. Se debe mejorar la técnica.

Dada la importancia de las praderas marinas por las funciones ecológicas que desempeñan y los bienes y servicios que ofrecen, se considera imprescindible la continuación de los trabajos sobre el conocimiento y funcionamiento de las praderas marinas. Además, en la actualidad, la especie *Zostera noltei* está considerada dentro del grupo de *Especies, subespecies y poblaciones en peligro de extinción* en el Catálogo Vasco de Especies Amenazadas de la Fauna y Flora Silvestre y Marina (BOPV nº 37, del 23 de febrero de 2011).

En este contexto, se considera interesante continuar investigando mediante pruebas, tanto en laboratorio como en campo, con semillas procedentes de las poblaciones vascas de *Zostera noltei* y evaluar su uso como alternativa de recuperación de praderas mediante siembra.

## Agradecimientos

El presente artículo se enmarca en el proyecto “Trabajos de restauración de *Zostera noltei*”, realizado en el marco del convenio de colaboración entre la Agencia Vasca del Agua-URA y AZTI. Quisiera agradecer al Parque Ecológico de Plaiaundi y al Patronato de la Reserva de la Biosfera Urdaibai por autorizar y facilitar los muestreos y experimentos en las marismas de Txingudi (Bidasoa) y dentro de la Reserva de la Biosfera de Urdaibai (Oka), respectivamente; y también a los revisores Guillem Chust y Javier Franco que, con sus sugerencias, han mejorado sustancialmente este trabajo. Esta es la contribución nº 727 de la Unidad de Investigación Marina de AZTI.

## Bibliografía

- Alexandre, A., S. Cabaço, R. Santos y E.A. Serrao, 2006. Timing and success of reproductive stages in the seagrass *Zostera noltii*. *Aquatic Botany*, 85: 219-223.
- Auby, I. y P.J. Labourg, 1996. Seasonal dynamics of *Zostera noltii* Hornem. in the bay of Arcachon (France). *Journal of Sea Research*, 35: 269-277.
- Berkovic, B., S. Cabaço, J.M. Barrio, R. Santos, E.A. Serrao y F. Alberto, 2014. Extending the life history of a clonal aquatic plant: Dispersal potential of sexual and asexual propagules of *Zostera noltii*. *Aquatic Botany*, 113: 123-129.
- Borja, A., J. Bald, M.J. Belzunce, J., Franco, I. Muxika, V. Pérez, O. Solaun, A. Uriarte, V. Valencia, I. Adarraga, F. Aguirrezabalaga, I. Cruz, A., Laza, M.A. Marquiegui, J. Martínez, E. Orive, J.M<sup>a</sup> Ruiz, J.C. Sola, J.M<sup>a</sup> Trigueros y A. Manzanos, 2005. Red de seguimiento del estado ecológico de las aguas de transición y costeras de la Comunidad Autónoma del País Vasco. Informe de AZTI-Tecnalia para la Dirección de Aguas del Departamento de Ordenación del Territorio y Medio Ambiente, Gobierno Vasco. 14 Tomos, 718 pp.
- Brenchley, J.L. y R.J. Probert, 1998. Seed germination responses to some environmental factors in the seagrass *Zostera capricorni* from eastern Australia. *Aquatic Botany*, 62: 177-188.
- Bubani, P., 1897-1901. Flora pyrenaea per Ordines Naturales gradatim digesta. 4 vol. Ed. Ulricus Hoeplius. Mediolani.
- Busch, K.E., R.R. Golden, T. Parham, L.P. Karrh, M.J. Lewandowski y M.D. Naylor, 2010. Large-scale *Zostera marina* (eelgrass) restoration in Chesapeake Bay, Maryland, USA. Part I: a comparison of techniques and associated costs. *Restoration Ecology*, 18(4): 490-500.
- Campos, J.A. y F. Silván, 2001. Flora amenazada de la Reserva de la Biosfera de Urdaibai. Informe Inédito realizado para el Dpto. de Medio Ambiente y Ordenación del Territorio del Gobierno Vasco. Vitoria-Gasteiz. 147 pp.
- Catalan, P. y I. Aizpuru, 1985. Aportación al catálogo florístico de la cuenca del Bidasoa (Guipúzcoa y Navarra). *Munibe (Ciencias Naturales-Natur Zientziak)*, 37: 17-86.
- Catalan, P. y I. Aizpuru, 1986. Datos florísticos de las cuencas de los ríos Bidasoa y Urumea. *Munibe (Ciencias Naturales-Natur Zientziak)*, 38: 163-168.
- Conacher, C.A., I.R. Poiner, J. Butler, S. Pun y D.J. Tree, 1994. Germination, storage and viability testing of seeds of *Zostera capricorni* Aschers. from a tropical bay in Australia. *Aquatic Botany*, 49: 47-58.
- Dooley, F.D., S. Wyllie-Echeverria y E. Van Volkenburgh, 2013. Long-term seed storage and viability of *Zostera marina*. *Aquatic Botany*, 111: 130-134.
- Garmendia, J.M., Á. Borja y J. Franco, 2008. Trabajos de restauración de *Zostera noltii* en la costa vasca. Informe elaborado por AZTI-Tecnalia para la Agencia Vasca del Agua. 94 pp.
- Garmendia, J.M., J.G. Rodríguez, Á. Borja, Á. y J. Franco, 2010. Clasificación de los estuarios del País Vasco como zonas potenciales para la restauración de praderas intermareales de *Zostera noltii*. *Revista de Investigación Marina*, 17(4): 40-61.
- Garmendia, J.M., M. Valle, Á. Borja, G. Chust y J. Franco, 2013. Cartografía de *Zostera noltii* en la costa vasca: cambios recientes en su distribución (2008-2012). *Revista de Investigación Marina, AZTI-Tecnalia*, 20(1): 1-22.
- Garmendia, J.M., M. Valle, Á. Borja, G. Chust y J. Franco, 2013. Cartografía de *Zostera noltii* en la costa vasca: cambios recientes en su distribución (2008-2012). *Revista de Investigación Marina, AZTI-Tecnalia*, 20(1): 1-22. <http://www.azti.es/rim>.
- Golden, R.R., K.E. Busch, L.P. Karrh, T.A. Parham, M.J. Lewandowski y M.D. Naylor, 2010. Large-scale *Zostera marina* (eelgrass) restoration in Chesapeake Bay, Maryland, USA. Part II: a comparison of restoration methods in the Patuxet and Potomac Rivers. *Restoration Ecology*, 18(4): 501-513.
- Gredilla, A.F., 1913. Corografía botánica. Carrera y Candi, F., Geografía general del País Vasco-Navarro. Vol. País Vasco-Navarro: 459-567. A. Martín. Barcelona.
- Greve, T.M., D. Krause-Jensen, M.B. Rasmussen y P.B. Christensen 2005. Means or rapid eelgrass (*Zostera marina* L.) recolonisation in former dieback areas. *Aquatic Botany*, 82: 143-156.
- Harwell, M.C. y R.J. Orth, 1999. Eelgrass (*Zostera marina* L.) seed protection for field experiments and implications for large-scale restoration. *Aquatic Botany*, 64: 51-61.
- Hootsmans M.J.M., J.E. Veeremat y W. van Vierssen, 1987. Seed-bank development, germination and early seedling survival of two seagrass species from The Netherlands: *Zostera marina* L. and *Zostera noltii* Hornem. *Aquatic Botany*, 28: 275-285.
- Jarvis, J.C., M.J. Brush y K.A. Moore, 2014. Modeling loss and recovery of *Zostera marina* beds in the Chesapeake Bay: The role of seedlings and seed-bank viability. *Aquatic Botany*, 113: 32-45.
- Kishima, J., S. Harada y R. Sakurai, 2011. Suitable water temperature for seed storage of *Zostera japonica* for subtropical seagrass bed restoration. *Ecological Engineering*, 37: 1416-1419.
- Laborda, J.A., I. Cimadevilla, L. Capdevila y J.R. García, 1997. Distribución de las praderas de *Zostera noltii* Hornem., 1832 en el litoral del norte de España. *Publicaciones especiales del Instituto Español de Oceanografía*, 23: 273-282.
- Lissardy, M., M.M. de Casamayor y F. Sanchez, 2007. Cartographie de l'herbier de *Zostera noltii* dans la Baie de Txingudi. Informe CERCA-ADERA. 12 pp.

- Loques, F., G. Caye y A. Meinesz, 1988. Flowering and fruiting of *Zostera noltii* in Golfe Juan (French Mediterranean). *Aquatic Botany*, 32: 341-352.
- Loques, F., G. Caye y A. Meinesz, 1991. Germination in the marine phanerogam *Zostera noltii* Hornemann at Golfe Juan, French Mediterranean. *Aquatic Botany*, 38: 249-260.
- Marion, S.R. y R.J. Orth, 2010a. Factors influencing seedling establishment rates in *Zostera marina* and their implications for seagrass restoration. *Restoration Ecology*, 18(4): 549-559.
- Marion, S.R. y R.J. Orth, 2010b. Innovative techniques for large-scale seagrass restoration using *Zostera marina* (eelgrass) seeds. *Restoration Ecology*, 18(4): 514-526.
- Milchakova, N.A., 1999. On the status of seagrass communities in the Black Sea. *Aquatic Botany*, 65: 21-32.
- Morita, T., M. Kakinuma, G. Mizuno, I. Okumura, H. Kokubu, A. Kurashima y M. Maegawa, 2010. Morphological characteristics of annual *Zostera marina* shoots at various germination temperatures. *Aquatic Botany*, 92: 49-54.
- Orth, R.J., S.R. Marion, S. Granger y M. Traber, 2009. Evaluation of a mechanical seed planter for transplanting *Zostera marina* (eelgrass) seeds. *Aquatic Botany*, 90: 204-208.
- Otxoa, E., Oyanarte, T., Patino, S., Valencia, J., Miguel, E., Prieto, A. y J. Elorza, 2007. Cartografiado a escala 1:5000 de las poblaciones vizcaínas de plantas incluidas en el catálogo vasco de especies amenazadas. Departamento de Botánica, Sociedad de Ciencias Naturales de Sestao, 71 pp.
- Pan, J., H. Han, X. Jiang, W. Zhang, N. Zhao, S. Song, X. Li y X. Li, 2012. Dessiccation, moisture content and germination of *Zostera marina* L. seed. *Restoration Ecology*, 20(3): 311-314.
- Peterken, C.J. y C.A. Conacher, 1997. Seed germination and recolonisation of *Zostera capricorni* after grazing by dugongs. *Aquatic Botany*, 59: 333-340.
- Philippart, C.J.M., 1995. Seasonal variation in growth and biomass of an intertidal *Zostera noltii* stand in the dutch Wadden Sea. *Netherlands Journal of Sea Research*, 33: 205-218.
- Pickerell, C.H., S. Schott y S. Wyllie-Echeverria, 2005. Buoy-deployed seeding: demonstration of a new eelgrass (*Zostera marina* L.) planting method. *Ecological Engineering*, 25: 127-136.
- Sanchez F., M. Lissardy M. y M.N. de Casamajor, 2010. Points de surveillance DCE en Côte Basque: Masse d'eau FRFT8 Bidassoa – Bilan 2007/2008/2009. Rapport R.INT.DCN/HGS/LRHA 10-001, 31 pp.
- Sanchez F., M.N. de Casamajor M.N. y M. Lissardy, 2013. Suivi stationnel de l'herbier à zostères *Zostera noltei* de la masse d'eau FRFT8 Bidassoa – 2012. Rapport R.INT.DCN/RBE/HGS/LRHA 13-003, 28 pp.
- Sanchez F., M.N. de Casamajor M.N. y M. Lissardy, 2014. Suivis stationnel et surfacique de l'herbier à *Zostera noltei* de la masse d'eau FRFT8 Bidassoa – 2013. Rapport R.INT.DCN/RBE/HGS/LRHA 14-002, 24 pp.
- Silván, F. y J.A. Campos, 2002. Estudio de la flora vascular amenazada de los estuarios de la Comunidad Autónoma del País Vasco. Informe inédito realizado para el Dpto. de Medio Ambiente y Ordenación del Territorio del Gobierno Vasco. Vitoria-Gasteiz. 100 pp.
- Statton, J., M.L. Cambridge, K.W. Dixon y G.A. Kendrick, 2013. Aquaculture of *Posidonia australis* seedlings for seagrass restoration programs: effect of sediment type and organic enrichment on growth. *Restoration Ecology*, 21(2): 250-259.
- Talavera, S., 2010. *Zostera* L. en Castroviejo, S., Aedo, C., Lainz, M., Muñoz Garmendia, F., Nieto Feliner, G., Paiva, J. & Benedí, C. (eds.). *Flora iberica* 17: 109-113. Real Jardín Botánico, CSIC, Madrid. <http://www.floraiberica.org/> [consultado el 05/09/2012]
- Tanner, C.E. y T. Parham, 2010. Growing *Zostera marina* (eelgrass) from seeds in land-based culture systems for use in restoration projects. *Restoration Ecology*, 18(4): 527-537.
- van Katwijk, M.M. y L.J.M. Wijgergangs, 2004. Effects of locally varying exposure, sediment type and low-tide water cover on *Zostera marina* recruitment from seed. *Aquatic Botany*, 80: 1-12.
- Valle, M., Á. Borja, I. Galparsoro, J.M. Garmendia y G. Chust, 2010. Estudio del hábitat idóneo para *Zostera noltii* y su modificación bajo un escenario de cambio climático en el estuario del Oka. *Revista de Investigación Marina*, 17(1): 1-12.
- Valle, M., Á. Borja, G. Chust, G., I. Galparsoro y J.M. Garmendia, 2011. Modelling suitable estuarine habitats for *Zostera noltii*, using Ecological Niche Factor Analysis and Bathymetric LiDAR. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, 94: 144-154.
- Valle, M., 2014. Seagrass meadows under a changing climate: habitat modelling, restoration and monitoring. Tesis Doctoral, Dpto. de Biología Vegetal y Ecología, Universidad del País Vasco, Leioa, 210 pp.
- Valle, M., G. Chust, A. del Campo, M.S. Wisz, S.M. Olsen, J.M. Garmendia y Á. Borja, 2014. Projecting future distribution of the seagrass *Zostera noltii* under global warming and sea-level rise. *Biological Conservation*, 170: 74-85.
- Valle, M., J.M. Garmendia, G. Chust, J. Franco y Á. Borja, 2015. Increasing the chance of a successful restoration of *Zostera noltii* meadows. *Aquatic Botany*, 127: 12-19.
- Vermaat, J.E., J.A.J. Beijer, R. Gijlstra, M.J.M. Hootsmans, C.J.M. Philippart, N.W. van den Brink y W. van Vierssen, 1993. Leaf dynamics and standing stocks of intertidal *Zostera noltii* Hornem. and *Cymodocea nodosa* (Ucria) Ascherson on the Banc d'Arguin (Mauritania). *Hydrobiologia*, 258: 59-72.
- Zipperle, A.M., J.A. Coyer, K. Reise, W.T. Stam y J.L. Olsen, 2009. Evidence for persistent seed banks in dwarf eelgrass *Zostera noltii* in the German Wadden Sea. *Marine Ecology Progress Series*, 380: 73-80.

