

Respuesta germinativa de *Brassica repanda* (Willd.) DC. subsp. *maritima* (Willk.) Heywood., *Lavandula pedunculata* (Mill.) Cav. y *Silene cambessedesii* Boiss. & Reut.

Noemí Fuentes Molina¹ & Elena Estrelles²

¹ Departamento de Biología Vegetal (Botánica), Facultad de Biología, Universidad de Murcia, 30100 Murcia.

² Jardín Botánico de la Universidad de Valencia, Banco de Germoplasma, C/Quart 80, 46008 Valencia.

Resumen

Correspondencia

N. Fuentes

E-mail: noemipal@um.es

Tel. & Fax: 968-364995

Recibido: 12 Junio 2005

Aceptado: 15 Septiembre 2005

Se estudia el comportamiento germinativo de tres especies de interés para abordar distintos programas de restauración en sistemas de matorral interior y vegetación litoral. La respuesta germinativa de las especies difirió bajo las dos condiciones de temperatura ensayadas (20°C y 25/10°C, 16 horas luz). *Brassica repanda* (Willd.) DC. subsp. *maritima* (Willk.) Heywood incrementó su porcentaje de germinación frente a las temperaturas alternantes mientras que *Lavandula pedunculata* (Mill.) Cav. ofreció resultados similares ante las dos condiciones de temperatura. *Silene cambessedesii* Boiss. & Reut. fue la única especie que requirió de tratamientos pregerminativos, constatándose la presencia de dormiciones.

Palabras clave: Semillas, Dormición, Giberelinas, Estratificación.

Abstract

Germination response of Brassica repanda (Willd.) DC. subsp. maritima (Willk.) Heywood, Lavandula pedunculata (Mill.) Cav. and Silene cambessedesii Boiss. & Reut.

Germination response of *Brassica repanda* subsp. *maritima*, *Lavandula pedunculata* and *Silene cambessedesii* has been investigated under laboratory conditions. There were differences in their germination behaviour. Germination percentage of *Brassica repanda* (Willd.) DC. subsp. *maritima* (Willk.) Heywood showed an increase under alternant temperature regime (25/10°C, 16:8 photoperiod) whereas *Lavandula pedunculata* (Mill.) Cav. germinated equally well under both constant (20°C, 16:8 photoperiod) and alternant temperature conditions. Dormancy was revealed in *Silene cambessedesii* Boiss. & Reut. since this species needed breaking-dormancy treatments for acceptable germination achievement.

Key words: Seeds, Dormancy, Gibberellic acid, Stratification.

Introducción

Con la conservación y suministro de recursos genéticos (semillas y esporas) los bancos de germoplas-

ma se consolidan como una de las herramientas fundamentales en el ámbito de los proyectos de recuperación y manejo de especies amenazadas y restauración de hábitats degradados (Gómez-Campo et al.

1985; Cabello et al. 1998; Herranz *et al.* 2002; Pérez-García et al. 1995; Laguna et al. 1998). Desde su creación en el año 1991, el Banco de Germoplasma del Jardín Botánico de Valencia viene participando activamente en la conservación *ex situ* de especies vegetales silvestres endémicas, raras y/o amenazadas de la flora del mediterráneo occidental, especialmente las del territorio valenciano (Estrelles et al. 2003).

Junto con el programa de conservación, el estudio de la respuesta germinativa de las especies posibilita a) obtener protocolos de germinación que permitan la producción de planta de un modo rápido y eficaz y b) detectar, si existen, factores de tipo adaptativo inherentes a esta fase del ciclo biológico, que favorezcan la supervivencia de las plántulas tras la germinación. Con tal fin se analiza la viabilidad de las semillas, se establece la temperatura óptima para la germinación y se determina la presencia/ausencia de dormiciones. Son estas líneas las que constituyen el marco del presente trabajo. Nuestro objetivo consistió en la determinación de las condiciones óptimas de germinación de *Lavandula pedunculata* (Mill.) Cav., *Silene cambessedesii* Boiss. & Reut. y *Brassica repanda* (Willd.) DC. subsp. *maritima* (Willk.) Heywood, especies que figuran en el catálogo de Flora endémica, rara o amenazada de la Comunidad Valenciana (Laguna et al. 1998).

Material y métodos

Se seleccionaron los taxones de trabajo entre una lista de especies de interés para abordar distintos programas de restauración en sistemas de matorral interior y vegetación litoral. *Lavandula pedunculata* (Mill.) Cav. es un endemismo ibérico que aparece puntualmente en la Comunidad Valenciana, donde alcanza su límite oriental en zonas frescas y no muy secas del interior. Se trata de un arbusto aromático que forma parte de matorrales laxos y soleados sobre sustratos arenosos silíceos por áreas más o menos elevadas de montaña. *Silene cambessedesii* Boiss. & Reut., endemismo iberolevantino, es una planta

anual que coloniza los arenales marítimos poco alterados y no nitrificados. Tiene su área de distribución principal en Ibiza y Formentera. Se localiza también en las costas castellonenses meridionales, restringida en la actualidad a dos localidades (Nules-Moncófar y Almenara). La rareza de la especie y las amenazas que suponen una fuerte presión antrópica y urbanística impulsaron su inclusión en el Atlas y Libro Rojo de la Flora Vasculosa española, catalogada como especie vulnerable (Bañares et al. 2003). *Brassica repanda* (Willd.) DC. subsp. *maritima* (Willk.) Heywood, endemismo exclusivo de la Comunidad Valenciana, es una planta perenne con hojas en roseta basal que habita en grietas y repisas de roquedos calizos litorales del Norte de Alicante y Sur de Valencia, interviniendo a veces en matorrales sobre suelos más descarnados o sobre sustratos muy abruptos (Laguna et al. 1998). La localidad de origen y la fecha de recolección de las especies se especifican en la Tabla 1.

Recolección y procesado de las muestras

Con la intención de maximizar la representatividad y la calidad del material se extremó la precaución en el momento de la recolección. Se recolectaron semillas maduras del mayor número posible de individuos de las poblaciones seleccionadas. Se consideró indicativo del grado de madurez de las mismas su color y consistencia. Se dejaron secar a temperatura y humedad ambiente, extendidas sobre bandejas de plástico en el laboratorio. Tras un mes bajo estas condiciones se procedió a la limpieza manual, extracción de las semillas y posterior almacenado en bolsas de papel hasta el momento de la siembra.

Viabilidad de las semillas

Se estimó la viabilidad de las semillas como análisis previo a los ensayos de germinación. Se aplicó el test de tetrazolio, técnica bioquímica que consiste en la tinción diferencial de tejidos (Ellis *et al.* 1985). El

Especies	Origen/UTM	Fecha
<i>Lavandula pedunculata</i> (Mill.) Cav.	Valencia, Sinarcas, El Ciruejo. 30S XK 04 52	4.10.2000
<i>Brassica repanda</i> (Willd.) DC. subsp. <i>maritima</i> (Willk.) Heywood	Valencia, Vilallonga de la Safor-Alt de la Safor. 30S YJ 37 05	12.07.2001
<i>Silene cambessedesii</i> Boiss. & Reut.	Castellón, Moncófar. 30S YK 44 06	11.5.2001

Tabla 1. Localidad de origen y fecha de recolección de las especies.

patrón de coloración resultante delimita tejidos viables (rojos), no viables (blancos) e intermedios (rosas). Para facilitar la exposición del embrión a la solución de tinción, se efectuó sobre las semillas (25 por especie) un corte longitudinal a la altura del eje embrionario.

Germinación

Para analizar el comportamiento germinativo de las especies en condiciones inducidas de laboratorio se eligieron dos regímenes de temperatura: constante (20°C) y alternante (25/10°C). Dos réplicas con 25 semillas por especie y tratamiento se sembraron en placas petri con agar al 0.7 % (7 g L⁻¹) y se incubaron en cámaras de germinación bajo las condiciones térmicas descritas y un fotoperíodo de 16 horas luz. Desde el momento de la recolección hasta el inicio de los ensayos transcurrieron 14, 8 y 6 meses para las semillas de *Lavandula pedunculata* (Mill.) Cav., *Silene cambessedesii* Boiss. & Reut. y *Brassica repanda* (Willd.) DC. subsp. *maritima* (Willk.) Heywood respectivamente.

El seguimiento de la germinación (emergencia de la radícula y desarrollo activo de la misma) se llevó a cabo diariamente. La respuesta germinativa se evaluó como el número de semillas germinadas (capacidad germinativa), expresada como porcentaje, al cabo de 30 días.

Tratamientos pregerminativos

Se consideró necesario el empleo de tratamientos adicionales cuando las especies mostraron porcentajes de germinación bajos (< 50 %), siempre y cuando los resultados del test de tetrazolio no indicaran baja viabilidad de las mismas. Se estimó conveniente la aplicación de Giberelinas (250 mg L⁻¹) y la realización de dos experimentos de estratificación (fría y cálida).

En la estratificación cálida, las semillas se sometieron a un proceso de postmaduración a 45 °C en un ambiente con una humedad relativa del 60% controlada mediante una solución saturada de LiCl (30 g/100 mL). Se mantuvieron en estas condiciones du-

rante 2, 3, 4 y 6 semanas. En la estratificación fría, semillas sembradas en placas petri con agar permanecieron a 5°C durante 4 y 8 semanas.

En los tres experimentos se emplearon dos réplicas con 25 semillas por especie y tratamiento. Finalizados los tratamientos, se incubaron en cámaras de germinación a 20°C con un fotoperíodo de 16 horas luz.

Análisis estadístico de los datos

El número de réplicas por tratamiento quedó limitado por el número de semillas disponible, conscientes de las repercusiones en el posterior análisis estadístico de los datos.

Los resultados obtenidos bajo las dos condiciones térmicas se analizaron mediante el test de Mann-Whitney. La prueba de los Rangos con signos de Willcoxon evaluó posibles diferencias entre el tratamiento con Giberelinas y los experimentos de estratificación. El test de Kruskal-Wallis se empleó al comparar los distintos periodos de estratificación cálida en *Silene cambessedesii* Boiss. & Reut. Todo el análisis se realizó con el paquete estadístico SPSS 11.5.

Resultados

Atendiendo a los valores de viabilidad estimados para *Brassica repanda* (Willd.) DC. subsp. *maritima* (Willk.) Heywood y *Silene cambessedesii* Boiss. & Reut. (Tabla 2), los porcentajes de germinación se consideraron aceptables en la primera especie y ningún tratamiento adicional fue llevado a cabo (Tabla 3). Sin embargo, la respuesta germinativa de *Silene cambessedesii* Boiss. & Reut. mostró la existencia de algún mecanismo endógeno (dormición) capaz de obstaculizar la germinación (Tabla 3). Los porcentajes de germinación observados tras la aplicación de GAs y la exposición a los diferentes periodos de estratificación (cálida y fría) se reflejan en las Tablas 4 y 5. En *Lavandula pedunculata* (Mill.) Cav. constatamos una contradicción, puesto que la estima de la viabilidad de las semillas resultó ser inferior a los porcentajes finales de germinación (Tabla 2 y 3). No

Especies	Viabilidad
<i>Lavandula pedunculata</i> (Mill.) Cav.	34 %
<i>Brassica repanda</i> (Willd.) DC. subsp. <i>maritima</i> (Willk.) Heywood	66 %
<i>Silene cambessedesii</i> Boiss. & Reut.	56 %

Tabla 2. Estima de la viabilidad derivada de la aplicación del test de Tetrazolio. Los valores se reflejan como porcentajes.

Especies	Temperatura		Test de Mann-Whitney	
	20 °C	25/10 °C	Z	P
<i>Lavandula pedunculata</i> (Mill.) Cav.	66 ± 8.48 %	60 %	-1,000	0,667
<i>Brassica repanda</i> (Willd.) DC. subsp. <i>maritima</i> (Willk.) Heywood	8 %	50 ± 8.48 %	-1,633	0,333
<i>Silene cambessedesii</i> Boiss. & Reut.	20 ± 11.31 %	10 ± 8.48 %	-0,775	0,667

Tabla 3. Porcentajes de germinación final (\pm desv. típica) de las especies bajo las dos condiciones térmicas. También se muestra la significatividad del contraste de Mann-Whitney para ambos tratamientos.

Especie	Giberelinas	
	con	sin
<i>Silene cambessedesii</i> Boiss. & Reut.	12 %	10 ± 2.82 %

Tabla 4. Porcentajes de germinación final (\pm desv. típica) de *Silene cambessedesii* Boiss. & Reut. tras la aplicación de Giberelinas. Condiciones incubación: 20°C, 16:8 horas luz.

Especie	Estratificación fría		Estratificación cálida			
	4 sem.	8 sem.	2 sem.	3 sem.	4 sem.	6 sem.
<i>Silene cambessedesii</i> Boiss. & Reut.	0 %	0 %	12 ± 11.31 %	30 ± 14.14 %	34 ± 2.82 %	62 ± 8.48 %

Tabla 5. Porcentajes de germinación final (\pm desv. típica) de *Silene cambessedesii* Boiss. & Reut. tras los periodos de estratificación. Condiciones incubación: 20°C, 16:8 horas luz.

se observaron diferencias estadísticamente significativas (prueba de Mann-Whitney) entre las tasas de germinación de las tres especies bajo los dos regímenes de temperatura empleados (Tabla 3). Tampoco entre los valores de germinación resultantes del experimento estratificación cálida y los porcentajes de germinación control ($C^2=6.942$; $gl=4$; $p=0.139$) de *Silene cambessedesii* Boiss. & Reut., tras la aplicación de GAs ($Z = -1.000$; $p = 0.317$), ni entre estratificación cálida y germinación GAs 30 días ($Z = -1.289$; $p = 0.197$). La germinación fue nula tras el experimento estratificación fría.

Discusión y conclusiones

Dos de las tres especies estudiadas no requirieron tratamientos pregerminativos. La respuesta de *Lavandula pedunculata* (Mill.) Cav. fue similar bajo las dos temperaturas ensayadas. La discordancia entre los porcentajes de viabilidad y germinación nos inclina a pensar en la idoneidad del test de tetrazolio para esta especie. *Brassica repanda* (Willd.) DC. subsp. *maritima* (Willk.) Heywood mostró un incremento en sus porcentajes de germinación ante las condiciones

de temperatura alternantes. Cabe remarcar que los contrastes estadísticos no muestran estas tendencias como significativas, probablemente debido a las propias constricciones del diseño experimental. *Silene cambessedesii* Boiss. & Reut. muestra claros mecanismos de dormición que previenen la germinación. El análisis de las características morfológicas de las semillas (cubiertas permeables al agua; embriones morfológicamente maduros), la evaluación de su respuesta ante los tratamientos pregerminativos y una revisión bibliográfica al respecto (Baskin & Baskin 1998; Thompson 1968, 1970 a, 1970 b, 1975; Montesinos 2002; Guara *et al.* 1998) sugieren que el tipo de dormición exhibido atiende a causas fisiológicas.

Para que el ciclo vital de una planta finalice con éxito, la germinación ha de transcurrir en una época que maximice las oportunidades tanto para el establecimiento de las plántulas como el desarrollo posterior de la planta. *Silene cambessedesii* Boiss. & Reut. florece en primavera y dispersa las semillas a finales de esta estación o principios de verano. Si las semillas germinaran en este momento, las plántulas no resistirían las condiciones de estrés hídrico y elevadas temperaturas características de la época esti-

val mediterránea. Las temperaturas estivales, simuladas mediante el experimento de estratificación cálida, intervienen activamente en el proceso de postmaduración de las semillas (pérdida de dormición primaria). Su condición fisiológica (dormición) evita que la germinación tenga lugar en una época desfavorable para la especie. La germinación se retrasa hasta el otoño.

Superado el estado de latencia, es fundamental que las condiciones del medio se ajusten a las que las especies requieren para germinar. En caso contrario, las semillas entrarían de nuevo en estado de dormición (Baskin & Baskin 1971, 1972, 1978, 1988, 1989, 1998; Baskin *et al.* 2003a, 2003b, 2004a, 2004b). Este comportamiento se indujo en semillas de *Silene cambedesii* Boiss. & Reut. sometidas al periodo de estratificación fría.

Referencias

- Bañares Á, Blanca G, Güemes J, Moreno JC & Ortiz S., eds. 2003. Atlas y Libro Rojo de la Flora Vascular Amenazada de España. Madrid: Dirección General de Conservación de la Naturaleza.
- Baskin JM & Baskin CC. 1971. Germination of winter annuals in July and survival of the seedlings. *Bulletin of the Torrey Botanical Club* 98: 272-276.
- Baskin JM & Baskin CC. 1972. Physiological ecology of germination of *Viola rafinesquii*. *American Journal of Botany* 59: 981-988.
- Baskin JM & Baskin CC. 1978. Temperatures for afterripening of seeds of a winter annual induced into secondary dormancy by low winter temperatures. *Bulletin of the Torrey Botanical Club* 105: 104-107.
- Baskin CC & Baskin JM. 1988. Germination ecophysiology of herbaceous plant species in a temperate region. *American Journal of Botany* 75: 286-305.
- Baskin JM & Baskin CC. 1989. Physiology of dormancy and germination in relation to seed bank ecology. In *Ecology of Soil Seed Banks* (Leck MA *et al.*, eds.). San Diego: Academic Press, pp. 53-66.
- Baskin CC & Baskin JM. 1998. *Seeds: ecology, biogeography and evolution of dormancy and germination*. San Diego: Academic Press.
- Baskin CC, Baskin JM & Chester EW. 2003a. Seasonal changes in the germination responses of buried seeds of three native eastern North American winter annuals. *Plant Species Biology* 18: 59-66.
- Baskin CC, Baskin JM & Chester EW. 2003b. Ecological aspects of seed dormancy-break and germination in *Heteranthera limosa* (Pontederiaceae), a summer annual weed of rice fields. *Weed Research* 43: 103-107.
- Baskin JM & Baskin CC. 2004a. A classification system for seed dormancy. *Seed Science Research* 14: 1-16.
- Baskin CC, Milberg P, Andersson L & Baskin JM. 2004b. Germination ecology of seeds of the annual weeds *Capsella bursa-pastoris* and *Descurainia sophia* originating from high northern latitudes. *Weed Research* 44: 60-68.
- Bewley JD & Black M. 1994. *Seeds. Physiology of Development and Germination*. New York: Plenum Press, 2nd edition.
- Cabello ML, Ruiz T & Devesa JA. 1998. Ensayos de germinación en endemismos Ibéricos. *Acta Botanica Malacitana* 23: 59-69.
- Ellis RH, Hong TD & Roberts EH. 1985. *Handbooks for Genebanks No.2. Handbook of Seed Technology for Genebanks Vol. II. Compendium of Specific Germination Information and Text Recommendations*. Rome: International Board for Plant Genetic Resources.
- Estrelles E, Fuentes N, Prieto J, Boscaiu M, Ballesteros D & Ibars A. 2003. Threatened Valencian flora: initiatives for its conservation. In *Seed conservation. Turning science into practice* (Smith RD *et al.* eds.). Kew: The Royal Botanic Gardens.
- Gómez-Campo C. ed. 1985. *Plant conservation in the Mediterranean area. Geobotany 7*. The Netherlands: Dordrecht W. Jun.
- Guara M, Mateu I, Montesinos D & Segarra JG. 1998. Informe final del convenio de colaboración para la investigación del sistema reproductivo y variabilidad genética de las especies vegetales vasculares raras, endémicas o amenazadas de la Comunidad Valenciana. Valencia: Generalitat Valenciana, Consejería de Medio Ambiente.
- Herranz JM, Ferrandis P, Copete MA & Martínez-Sánchez JJ. 2002. Influencia de la temperatura de incubación sobre la germinación de 23 endemismos vegetales Ibéricos o Iberoafrikanos. *Investigación Agraria. Producción y Protección Vegetales* 17 (2).
- Laguna E. ed. 1998. *Flora endémica rara o amenazada de la Comunidad Valenciana*. Valencia: Generalitat Valenciana, Consejería de Medio Ambiente.
- Montesinos D. 2002. Germinació i supervivència de llavors de *Silene diclinis*. Valencia: Generalitat Valenciana, Consejería de Medio Ambiente.
- Pérez-García F, Iriondo JM, González-Benito ME, Carnes LF, Tapia J, Prieto C, Plaza R & Pérez C. 1995. Germination studies in endemic plant species of the Iberian Peninsula. *Israel Journal of Plant Sciences* 43: 239-247.
- Thompson PA. 1968. Germination of Caryophyllaceae at low temperatures in relation to geographical distribution. *Nature* 217: 1156-1157.
- Thompson PA. 1970a. Germination of species of Caryophyllaceae in relation to their geographical

- distribution in Europe. *Annals of Botany* 34: 427-449.
- Thompson PA. 1970b. A comparison of the germination character of species of Caryophyllaceae collected in central Germany. *Journal of Ecology* 58: 699-711.
- Thompson PA. 1975. Characterization of the germination responses of *Silene dioica* (L.) Clairv. populations from Europe. *Annals of Botany* 39:1-19.
- Thompson K & Grime JP. 1983. A comparative study of germination responses to diurnally-fluctuating temperatures. *Journal of Applied Ecology* 20: 141-156.