



Universidad
Politécnica
de Cartagena



UNIVERSIDAD POLITÉCNICA DE CARTAGENA

ESCUELA TÉCNICA SUPERIOR DE INGENIERÍA AGRONÓMICA

Departamento de Producción Vegetal

PROYECTO FIN DE GRADO

“Estudio de la germinación de dos especies de *Teucrium* protegidas en la Región de Murcia “

Alumna:

Carmen Esperanza Gastón de
Iriarte Melgarejo

Directoras:

M^a José Vicente Colomer
Encarnación Conesa Gallego

Cartagena, octubre 2017

RESUMEN

Las dos especies estudiadas, *Teucrium freynii* y *Teucrium carthagenensis*, pertenecen a la familia de las *Labiatae* (*Lamiaceae*). Las lamiáceas o labiadas son hierbas, perennes o anuales, raramente suculentas, pero también plantas arbustivas o sufruticosas. Con respecto a la distribución, en el caso de *T. freynii* habitan en fisuras de rocas, matorrales en litosuelos, ocasionalmente sobre filitas y substratos sueltos; *T. carthagenensis* se encuentra en tomillares y matorrales nitrificados en todo tipo de substratos y coloniza campos de cultivo abandonados.

Para la germinación de dichas especies, afectan unos factores internos y externos, los cuales hacen más difícil la rotura de la cubierta de la semilla. Los factores internos son: madurez y viabilidad de semillas; los factores externos son: humedad, temperatura, gases y luz.

Además de influir dichos factores, también hay que tener en cuenta la dormición que presentan las semillas, se entiende por dormición la incapacidad de algunas semillas viables para germinar bajo condiciones ambientales apropiadas para que se dé su germinación, esta se verá superada cuando pase un tiempo. Hay cuatro tipos de dormición: primaria, secundaria, absoluta y relativa. Las causas por las que las semillas pueden presentar dormición son, entre otras, inmadurez del embrión, restricciones mecánicas para el desarrollo del embrión, requerimientos especiales de luz y/o temperatura, impermeabilidad de la cubierta de la semilla al agua o a los gases y presencia de sustancias inhibidoras.

Para “romper” la dormición de las semillas hay varios tipos de tratamientos como la escarificación ácida y fría, tratamientos con calor, lixiviación, aplicación exógena de giberelinas y estratificación fría y caliente.

Según ensayos de germinación llevados a cabo con semillas recién recolectadas en 2015, de *T. freynii* solo germinaron el 36% de las semillas incubadas a la temperatura alterna de 12/20°C y fotoperiodo de 12 horas luz, mientras que para *T. carthagenensis* únicamente se consiguió un 5% de semillas germinadas. Estos bajos porcentajes de germinación indicaron la presencia de fenómenos de dormición en las semillas de ambas especies. El objetivo de este estudio fue encontrar las técnicas más adecuadas para romper la dormición de las dos especies de *Teucrium*, para lo que se utilizaron distintas técnicas de escarificación, estratificación y adición de ácido giberélico en semillas conservadas desde 2015 en la “Colección de semillas Autoridad Portuaria de Cartagena” del Banco de Germoplasma de la Universidad Politécnica de Cartagena.

Los resultados obtenidos en este estudio fueron superiores a los que se consiguieron con semillas recién recolectadas. En el caso de *Teucrium freynii*, en condiciones de fotoperiodo de 12h de luz y tratamiento de estratificación a 25°C se obtuvo un total del 73% de semillas germinadas, los resultados más bajos se obtuvieron con la estratificación a 4°C (52%). En oscuridad continua, el tratamiento que otorgo los mejores resultados fue la aplicación de GA₃

con un 95% de semillas germinadas y los peores resultados se obtuvieron con estratificación a 4°C (23%).

El tiempo medio de germinación (TMG) de dicha especie, el mejor es de 20,22 días con el tratamiento de estratificación a 4°C y el peor el precalentamiento seco de 5 minutos (21,99 días).

Por lo tanto, para romper la dormición de las semillas de *T. freynii*, según los resultados obtenidos, es la adición de GA₃ seguido de la incubación en oscuridad continua.

En el caso de *Teucrium carthagenensis*, en condiciones de fotoperiodo de 12h de luz y tratamiento de estratificación a 4°C un total del 40% de semillas germinaron, los resultados más bajos se obtuvieron con el control (23%). En oscuridad continua, el tratamiento que otorgo los mejores resultados fue la aplicación de GA₃ con un 72% de semillas germinadas y los peores se obtuvieron con estratificación a 25°C (12%).

El tiempo medio de germinación (TMG) de dicha especie, es de 20,67 días con el tratamiento de estratificación a 25°C y el peor el control (25,86 días).

Por lo tanto, para romper la dormición de las semillas de *T. carthagenensis* según los resultados obtenidos, al igual que en *Teucrium freynii*, es la adición de GA₃ seguido de la incubación en oscuridad continua.

INDICE GENERAL

INDICE

INDICE DE TABLAS	8
INDICE DE FIGURAS.....	10
CAPÍTULO I: INTRODUCCIÓN	13
1.1 Encuadre taxonómico y descripción botánica	14
1.2 Descripción de las especies y del hábitat	15
1.3 Germinación y factores que influyen	21
1.3.1 Definición y fases.....	21
1.4 Dormición de semillas	27
1.4.1 Concepto de dormición	27
CAPÍTULO II: OBJETIVOS	32
CAPÍTULO III: MATERIAL Y METODOLOGÍA	34
3.1 Material.....	35
3.2 Metodología.....	35
CAPÍTULO IV: RESULTADOS Y DISCUSIÓN	41
4.1 Comportamiento germinativo de <i>Teucrium freynii</i>	42
4.1.1 Porcentaje de germinación	42
4.1.2 Tiempo Medio de Germinación.....	47
4.2 Comportamiento germinativo de <i>Teucrium carthagenensis</i>	49
4.2.1 Porcentaje de germinación	49
4.2.2 Tiempo Medio de Germinación.....	54
CAPÍTULO V: CONCLUSIONES	56
CAPÍTULO VI: REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	58

INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Factores que afectan a <i>Teucrium freynii</i>	42
Tabla 2. Efecto de los tratamientos utilizados para romper la dormición de las semillas y del fotoperiodo utilizado en la incubación sobre la germinación de <i>Teucrium freynii</i> (porcentaje de germinación \pm desviación típica). Letras mayúsculas diferentes para valores dentro de una fila y letras minúsculas diferentes para valores dentro de una columna indican una diferencia significativa (LSD test; $p < 0.05$).	43
Tabla 3. Influencia de los diferentes tratamientos en los tiempos medios de germinación (días) de las semillas de <i>Teucrium freynii</i> (días \pm desviación típica). Letras minúsculas diferentes indican una diferencia significativa (LSD test; $p < 0.05$).....	48
Tabla 4. Factores que afectan a <i>Teucrium carthagenensis</i>	50
Tabla 5. Efecto de los tratamientos utilizados para romper la dormición de las semillas y del fotoperiodo utilizado en la incubación sobre la germinación de <i>Teucrium carthagenensis</i> (porcentaje de germinación \pm desviación típica). Letras mayúsculas diferentes para valores dentro de una fila y letras minúsculas diferentes para valores dentro de una columna indican una diferencia significativa (LSD test; $p < 0.05$).	50
Tabla 6. Influencia de los diferentes tratamientos de ruptura de la dormición en los tiempos medios de germinación (días) de las semillas de <i>Teucrium carthagenensis</i> (días \pm desviación típica). Letras minúsculas diferentes indican una diferencia significativa (LSD test; $p < 0.05$)...54	

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Flor de <i>T. freynii</i> Fuente Almerinatura.com	15
Figura 2. Envés de hojas de <i>T. freynii</i> Fuente Almerinatura.com.....	16
Figura 3. Planta de <i>T. freynii</i> Fuente Almerinatura.com	16
Figura 4. Aspecto general de la planta de <i>T. freynii</i> Fuente Almerinatura.com.....	17
Figura 5. Aspecto general de la planta de <i>T. carthagenensis</i> Fuente Almerinatura.com	18
Figura 6. Localización de <i>T. carthagenensis</i> Fuente Floraprotegida.es.....	19
Figura 7. <i>T. carthagenensis</i> Fuente plantas de Murcia.	20
Figura 8. Tallo de <i>T. carthagenensis</i> Fuente plantas de Murcia.....	20
Figura 9. Inflorescencia de <i>T. carthagenensis</i> Fuente plantas de Murcia.....	20
Figura 10. Esquema de las fases de la imbibición de agua por una semilla, medida mediante el incremento en peso fresco durante el proceso de germinación (Figura modificada de Azcón--Bieto, J. y Talón, M. 1993. "Fisiología y Bioquímica Vegetal"	22
Figura 11. Efecto de la temperatura sobre la germinación de granos de trigo (<i>Triticum sativum</i>) Figura modificada de Pérez García; F. y Martínez-Laborde., J.B., 1994. "Introducción a la Fisiología Vegetal"	25
Figura 12. Ensayos de <i>T. carthagenensis</i> y <i>T. freynii</i>	38
Figura 13. Semillas germinadas de <i>T. freynii</i>	40
Figura 14. Semillas germinadas de <i>T. carthagenensis</i>	40
Figura 15. Diferencias de germinación de <i>Teucrium freynii</i> según el tratamiento utilizado para romper la dormición y las condiciones de iluminación durante la incubación de las semillas... 44	44
Figura 16. Efecto de los tratamientos utilizados para romper la dormición en el porcentaje de germinación de semillas de <i>Teucrium freynii</i> incubadas en condiciones de luz.....	45
Figura 17. Efecto de los tratamientos para romper la dormición en el porcentaje de germinación de semillas de <i>Teucrium freynii</i> incubadas en condiciones de oscuridad continua.	47
Figura 18. Efecto de los tratamientos para romper la dormición en el tiempo medio de germinación de semillas de <i>Teucrium freynii</i> incubadas en fotoperiodo de 12h luz.....	49

Figura 19. Diferencias de germinación de *Teucrium carthagenensis* según el tratamiento utilizado para romper la dormición y las condiciones de iluminación durante la incubación de las semillas. 51

Figura 20. Efecto de los tratamientos para romper la dormición en el porcentaje de germinación de semillas de *Teucrium carthagenense* incubadas en fotoperiodo de 12h luz..... 52

Figura 21. Efecto de los tratamientos para romper la dormición en el porcentaje de germinación de semillas de *Teucrium carthagenense* incubadas en oscuridad continua..... 53

Figura 22. Efecto de los tratamientos de ruptura de la dormición en el tiempo medio de germinación de semillas de *Teucrium carthagenense* incubadas en fotoperiodo de 12h luz..... 55

CAPÍTULO I: INTRODUCCIÓN

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Encuadre taxonómico y descripción botánica

El género *Teucrium* es un género de plantas de la familia *Labiatae (Lamiaceae)*. El género consta de 1090 taxones descritos, de los cuales unos 415 están aceptados, entre especies, subespecies, variedades, formas e híbridos. Muchos de estos taxones presentan una gran diversificación subespecífica.

Reino: Plantae

División: Magnoliophyta

Clase: Magnoliopsida

Subclase: Asteridae

Orden: Lamiales

Familia: Labiatae (*Lamiaceae*)

Subfamilia: Ajugoideae

Género: *Teucrium*

Especies: *Teucrium carthaginensis* y *Teucrium freynii*

Las lamiáceas o labiadas son generalmente hierbas, perennes o anuales, raramente suculentas, pero también plantas arbustivas o sufruticosas, y más infrecuentemente enredaderas e incluso árboles. Usualmente son aromáticas y de tallos aéreos de sección cuadrangular, glabros o pelosos, y más raramente con tallos subterráneos estoloníferos o tuberculados.

Las hojas son habitualmente opuestas, decusadas, a veces más de dos por verticilo, simples, de lineares a anchamente ovadas, enteras, serradas, dentadas, lobuladas o pinnatífidas.

Las inflorescencias se organizan en cimas formadas por verticilastros o multiflorales, con flores sentadas o pediceladas. Las brácteas son generalmente similares a las hojas y las bractéolas son frecuentemente lineares.

Las flores, generalmente pentámeras, son hermafroditas, a veces femeninas en el caso de ginodioecia, con cáliz actinomorfo o zigomorfo, con 5 sépalos soldados. La corola, de 5 pétalos soldados, es usualmente bilabiada, pero también puede ser unilabiada.

El androceo, tiene 4 estambres, el gineceo es bicarpelar, con ovario tetralocular debido a la formación de un falso septo en la pared del carpelo, y con los lóculos monospermos. El estilo, generalmente insertado en la base del gineceo, es filiforme, largo, fino, peloso o no, con estigma bifido, a veces dividido en 4.

El fruto es, en la mayoría de los casos un esquizocarpo, rodeado del cáliz persistente, formado por 4 núculas (tetranúcula) secas e indehiscentes, con o sin endosperma, de las que, a menudo, no maduran todas.

Género cosmopolita que se distribuye desde la cuenca mediterránea, que parece constituir el principal centro de diversificación con cerca del 90% de los taxones reconocidos, hasta la región macaronésica, América, Japón y Australia. Nativa en prácticamente toda Europa -excepto Suecia, Islandia y Moldavia- y también todo el Magreb (Castroviejo, 2010)

1.2 Descripción de las especies y del hábitat

- *Teucrium freynii*

Se trata de una mata pequeña, con pelos blancos. Tallos de 15-30 cm de altura. Hojas cortamente pecioladas, persistentes, ovales, festoneadas, pelosas por ambas caras. Inflorescencia capituliforme. Brácteas inferiores semejantes a las hojas. Flores hermafroditas, zigomorfas. Cáliz tubular, revestido de pelos cortos, con 5 dientes. Corola unilabiada, con el labio inferior pentalobado, de color blanco cremoso, a veces rosada. Androceo con 4 estambres exertos, didínamo. Ovario súpero, bicarpelar, tetralocular. Fruto tipo tetranúcula. La floración de esta planta va de abril a mayo (Castroviejo, 2010).

Endemismo del sureste español (Almería y Murcia) del que sus mejores poblaciones se encuentran en la Región de Murcia. Catalogado con la figura de protección de "De interés especial" Decreto 50/2003 por el que se aprueba el Catálogo Regional de Flora Silvestre Protegida, Anexo I. Se encuentra incluida en la Lista roja de la flora vascular de Andalucía.



Figura 1. Flor de *T. freynii*
Fuente Almerinatura.com

Se encuentra en fisuras de rocas, matorrales en litosuelos, ocasionalmente sobre filitas y sustratos sueltos. Extendida en las sierras litorales, desde Cabo de Palos hasta Águilas con una altitud máxima de 700 metros. Las mejores poblaciones de la especie se encuentran en Murcia, sin embargo, localmente puede ser muy abundante.

Se conocen híbridos con *T. lanigerum* Lag. (*T. x eloualidii* Sánchez Gómez & Navarro) y *T. capitatum* subsp. *gracillimum* (Rouy) Valdés-Berm. (*T. x portusmagnii* Sánchez Gómez et al.) en Atamaría (Cartagena) (Castroviejo, 2010)



Figura 2. Envés de hojas de *T. freynii*
Fuente Almerinatura.com



Figura 3. Planta de *T. freynii*
Fuente Almerinatura.com



Figura 2. Aspecto general de la planta de *T. freynii*.
Fuente Almerinatura.com

- *Teucrium carthaginiensis*

También se le llama vulgarmente “zamarrilla de Cartagena”

Se trata de plantas caméfitas, cespitosa, cepa leñosa, muy ramificada. Tallos ascendentes de hasta 20 cm de longitud, con indumento esparcido, pelos ramificados. Hojas opuestas, 5-10 x 2-3,5 mm, lanceolado-lineares, lobulado-crenadas en el tercio superior. Brácteas elipsoidales. Bractéolas lanceolado-lineares. Inflorescencia en racimo compacto, formando una cabezuela suboblunga. Cáliz 6-8 mm de longitud, tubular-inflado, glabrescente, pelos simples y glandulares. Dientes triangular-agudos, mucronados. Corola 7-9 mm de longitud, incluida en el tubo del cáliz, blanca, lóbulos latero-posteriores ciliados. Semillas 1,9-2,2 mm, pardo oscuras, ornamentadas.



Figura 3. Aspecto general de la planta de *T. carthaginensis*
Fuente Almerinatura.com

Endemismo exclusivo de las sierras de Cartagena y La Unión, que se distribuye por el litoral desde Cabo de Palos a la ciudad de Cartagena, presenta las mejores poblaciones entre Atamaría y San Julián (Cartagena) (Castroviejo, 2010).

En general, se trata de una especie relativamente abundante en su área de presencia, que sin embargo, es lo suficientemente reducida como para considerarla una especie protegida, incluida en la categoría "Vulnerable" en el Catálogo Regional de Flora Silvestre Protegida de la Región de Murcia (Decreto 50/2003, BORM núm. 131), y considerada "Casi amenazada" en la Lista Roja de la Flora Vasculare Española (Moreno, coord. 2010), según los criterios de la Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza (UICN).

Buena parte de las poblaciones existentes están ubicadas en espacios protegidos o territorios catalogados como LICs.

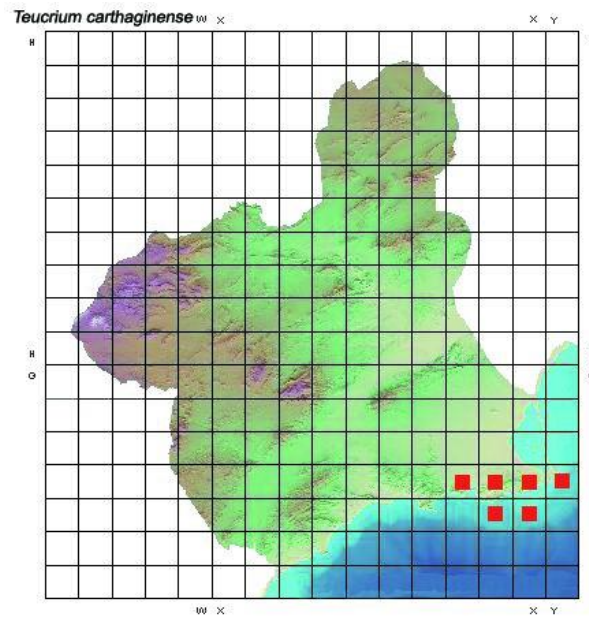


Figura 4. Localización de *T. carthagenense*
Fuente Floraprotegida.es

Habita en tomillares y matorrales nitrificados en todo tipo de substratos, además coloniza campos de cultivo abandonados, dentro del piso termomediterráneo con ombrótipo semiárido-seco. Se encuentra con especies acompañantes como: *Coris monspeliensis* subsp. *rivasiana*, *Helianthemum almeriense* subsp. *scopulorum*, *Satureja obovata* subsp. *canescens*, *Sideritis pusilla* subsp. *carthagenensis*, *Stipa tenacissima*, *Teucrium capitatum* subsp. *gracillimum*, *Thapsia villosa*, etc. (Castroviejo, 2010).



Figura 5. *T. carthagenensis*.
Fuente Plantas de Murcia



Figura 8. Tallo de *T. carthagenensis*
Fuente Plantas de Murcia



Figura 9. Inflorescencia de *T. carthagenensis*
Fuente Plantas de Murcia

1.3 Germinación y factores que influyen

1.3.1 Definición y fases

La germinación es el proceso mediante el cual una semilla se desarrolla hasta convertirse en una nueva planta. Este proceso se lleva a cabo cuando el embrión se hincha y la cubierta de la semilla se rompe.

Para que el proceso de germinación, es decir, la recuperación de la actividad biológica por parte de la semilla, tenga lugar, es necesario que se den una serie de condiciones ambientales favorables como un sustrato húmedo, suficiente disponibilidad de oxígeno que permita la respiración aerobia y, una temperatura adecuada para los distintos procesos metabólicos y para el desarrollo de la plántula.

La absorción de agua por la semilla desencadena una secuencia de cambios metabólicos, que incluyen la respiración, la síntesis proteica y la movilización de reservas. A su vez la división y el alargamiento celular en el embrión provoca la rotura de las cubiertas seminales, que generalmente se produce por la emergencia de la radícula.

Sin embargo, las semillas de muchas especies son incapaces de germinar, incluso cuando se encuentran en condiciones favorables. Esto es debido a que las semillas se encuentran en estado de latencia. Por ello, mientras no se den las condiciones adecuadas para la germinación, la semilla se mantendrá latente durante un tiempo variable, dependiendo de la especie, hasta que llegado un momento, pierda su capacidad de germinar.

Cuando una semilla germina, la primera estructura que emerge, de la mayoría de las especies, después de la rehidratación de los diferentes tejidos es la radícula. En aquellas semillas, en las que la radícula no es el primer acontecimiento morfológico, se consideran otros criterios para definir la germinación como la emergencia del coleóptilo en granos de cereales; la obtención de plantas normales; o el aumento de la actividad enzimática, tras la rehidratación de los tejidos.

En el proceso de germinación podemos distinguir tres fases (Figura 10):

- **Fase de hidratación:** La absorción de agua es el primer paso de la germinación, sin el cual el proceso no puede darse. Durante esta fase se produce una intensa absorción de agua por parte de los distintos tejidos que forman la semilla. Dicho incremento va acompañado de un aumento proporcional en la actividad respiratoria.
- **Fase de germinación:** Representa el verdadero proceso de la germinación. En ella se producen las transformaciones metabólicas, necesarias para el correcto desarrollo de la plántula. En esta fase la absorción de agua se reduce considerablemente, llegando incluso a detenerse.

- Fase de crecimiento:** Es la última fase de la germinación y se asocia con la emergencia de la radícula (cambio morfológico visible). Esta fase se caracteriza porque la absorción de agua vuelve a aumentar, así como la actividad respiratoria

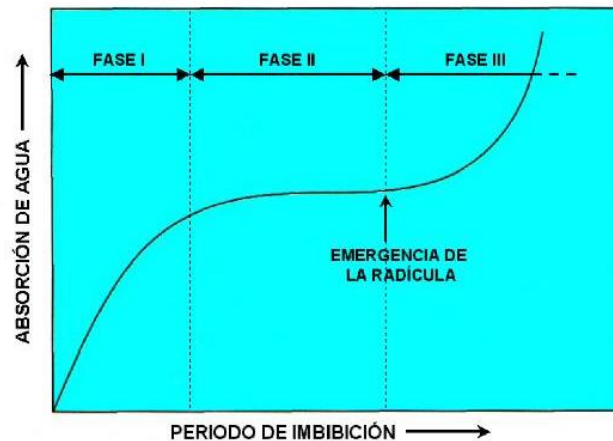


Figura 10. Esquema de las fases de la imbibición de agua por una semilla, medida mediante el incremento en peso fresco durante el proceso de germinación (Figura modificada de Azcón-Bieto, J. y Talón, M. 1993. "Fisiología y Bioquímica Vegetal"

Fuente UPV

La duración de cada una de estas fases depende de ciertas propiedades de las semillas, como su contenido en compuestos hidratables y la permeabilidad de las cubiertas al agua y al oxígeno. Estas fases también están afectadas por las condiciones del medio, como el nivel de humedad, las características y composición del sustrato, la temperatura, etc. Otro aspecto interesante es la relación de estas fases con el metabolismo de la semilla. La primera fase se produce tanto en semillas vivas y muertas y, por tanto, es independiente de la actividad metabólica de la semilla. Sin embargo, en las semillas viables, su metabolismo se activa por la hidratación. La segunda fase constituye un período de metabolismo activo previo a la germinación en las semillas viables o de inicio en las semillas muertas. La tercera fase se produce sólo en las semillas que germinan y obviamente se asocia a una fuerte actividad metabólica que comprende el inicio del crecimiento de la plántula y la movilización de las reservas. Por tanto, los factores externos que activan el metabolismo, como la temperatura, tienen un efecto estimulante en la última fase.

En las dos primeras fases de la germinación los procesos son reversibles, a partir de la fase de crecimiento se entra en una situación fisiológica irreversible. La semilla que haya superado la fase de germinación tendrá que pasar a la fase de crecimiento y originar una plántula, o por el contrario morir.

Los factores que afectan a la germinación los podemos dividir en dos tipos:

Factores internos.

Entre los factores internos que afectan a la germinación estudiaremos la madurez que presentan las semillas y la viabilidad de las mismas.

Madurez de las semillas

Decimos que una semilla es madura cuando ha alcanzado su completo desarrollo tanto desde el punto de vista morfológico como fisiológico.

La madurez morfológica se consigue cuando las distintas estructuras de la semilla han completado su desarrollo, dándose por finalizada cuando el embrión ha alcanzado su máximo desarrollo. También, se la relaciona con la deshidratación de los diferentes tejidos que forman la semilla. La madurez se suele alcanzar sobre la misma planta, sin embargo, existen algunas especies que diseminan sus semillas antes de que se alcance, como ocurre en las semillas de *Ginkgo biloba* o de muchas orquídeas, que presentan embriones muy rudimentarios, apenas diferenciados.

Aunque la semilla sea morfológicamente madura, muchas de ellas pueden seguir siendo incapaces de germinar porque necesitan experimentar aún una serie de transformaciones fisiológicas. Lo normal es que requieran la pérdida de sustancias inhibitoras de la germinación o la acumulación de sustancias promotoras. En general, necesitan reajustes en el equilibrio hormonal de la semilla y/o en la sensibilidad de sus tejidos para las distintas sustancias activas.

La madurez fisiológica se alcanza al mismo tiempo que la morfológica, como en la mayoría de las especies cultivadas; o bien puede haber una diferencia de semanas, meses y hasta años entre ambas.

Viabilidad de las semillas.

La viabilidad de las semillas es el período de tiempo durante el cual las semillas conservan su capacidad para germinar. Es un período variable y depende del tipo de semilla y de las condiciones de almacenamiento.

Atendiendo a la longevidad de las semillas, es decir, el tiempo que las semillas permanecen viables, pueden haber semillas que germinan, todavía, después de decenas o centenas de años; se da en semillas con una cubierta seminal dura como las leguminosas. El caso más extremo de retención de viabilidad es el de las semillas de *Nelumbo nucifera* encontradas en Manchuria con una antigüedad de unos 250 a 400 años.

En el extremo opuesto tenemos las que no sobreviven más que algunos días o meses, como es el caso de las semillas de arce (*Acer*), sauces (*Salix*) y chopos (*Populus*) que pierden su viabilidad en unas semanas; o los olmos (*Ulmus*) que permanecen viables 6 meses.

En general, la vida media de una semilla se sitúa entre 5 y 25 años. Para alargar más tiempo la vida de una semilla, ésta debe conservarse en las siguientes condiciones: mantenerla seca, dentro de unos límites; temperaturas bajas y, reducir al mínimo la presencia de oxígeno en el medio de conservación.

Factores externos.

Entre los factores ambientales más importantes que inciden en el proceso de germinación destacamos: humedad, temperatura y gases.

Humedad

La absorción de agua es el primer paso, y el más importante, que tiene lugar durante la germinación; porque para que la semilla recupere su metabolismo es necesaria la rehidratación de sus tejidos.

La entrada de agua en el interior de la semilla se debe exclusivamente a una diferencia de potencial hídrico entre la semilla y el medio que le rodea. En condiciones normales, este potencial hídrico es menor en las semillas secas que en el medio exterior. Por ello, hasta que emerge la radícula, el agua llega al embrión a través de las paredes celulares de la cubierta seminal; siempre a favor de un gradiente de potencial hídrico.

Aunque es necesaria el agua para la rehidratación de las semillas, un exceso de la misma actuaría desfavorablemente para la germinación, pues dificultaría la llegada de oxígeno al embrión.

Temperatura

La temperatura es un factor decisivo en el proceso de la germinación, ya que influye sobre las enzimas que regulan la velocidad de las reacciones bioquímicas que ocurren en la semilla después de la rehidratación. La actividad de cada enzima tiene lugar entre un máximo y un mínimo de temperatura, existiendo un óptimo intermedio. Del mismo modo, en el proceso de germinación pueden establecerse unos límites similares. Por ello, las semillas sólo germinan dentro de un cierto margen de temperatura. Si la temperatura es muy alta o muy baja, la germinación no tiene lugar, aunque las demás condiciones sean favorables.

La temperatura mínima sería aquella por debajo de la cual la germinación no se produce, y la máxima aquella por encima de la cual se anula igualmente el proceso. La temperatura óptima, intermedia entre ambas, puede definirse como la más adecuada para conseguir el mayor porcentaje de germinación en el menor tiempo posible.

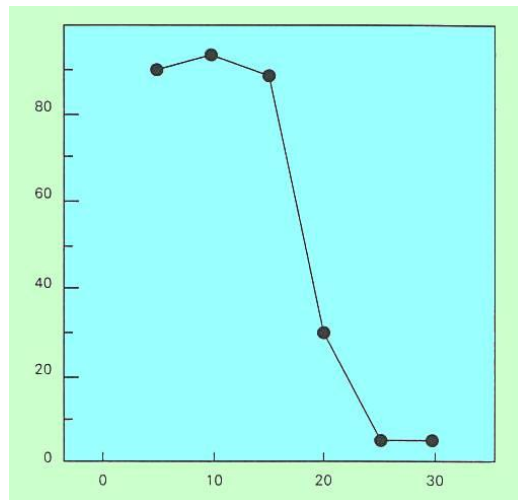


Figura 11. Efecto de la temperatura sobre la germinación de granos de trigo (*Triticum sativum*) Figura modificada de Pérez García; F. y Martínez-Laborde., J.B., 1994. "Introducción a la Fisiología Vegetal"

Fuente UPV

Las temperaturas compatibles con la germinación varían mucho de unas especies a otras. Sus límites suelen ser muy estrechos en semillas de especies adaptadas a hábitats muy concretos, y más amplios en semillas de especies de amplia distribución.

Las semillas de especies tropicales suelen germinar mejor a temperaturas elevadas, superiores a 25 °C. Las máximas temperaturas están entre 40 °C y 50 °C (*Cucumis sativus*, pepino, 48 °C). Sin embargo, las semillas de las especies de las zonas frías germinan mejor a temperaturas bajas, entre 5 °C y 15 °C. Ejemplo de ello son *Fagus sylvatica* (haya), *Trifolium repens* (trébol), y las especies alpinas, que pueden germinar a 0 °C. En la región mediterránea, las temperaturas más adecuadas para la germinación son entre 15 °C y 20 °C.

Por otra parte, se sabe que la alternancia de las temperaturas entre el día-noche actúan positivamente sobre las etapas de la germinación. Por lo que el óptimo térmico de la fase de germinación y el de la fase de crecimiento no tienen por qué coincidir. Así, unas temperaturas estimularían la fase de germinación y otras la fase de crecimiento.

Gases

La mayor parte de las semillas requieren para su germinación un medio suficientemente aireado que permita una adecuada disponibilidad de O₂ y CO₂. De esta forma el embrión obtiene la energía imprescindible para mantener sus actividades metabólicas.

La mayoría de las semillas germinan bien en atmósfera normal con 21% de O₂ y un 0,03% de CO₂. Sin embargo, existen algunas semillas que aumentan su porcentaje de germinación al disminuir el contenido de O₂ por debajo del 20%. Los casos mejor conocidos son *Typha latifolia* (espadaña) y *Cynodon dactylon* (grama), que germinan mejor en presencia de un 8% de O₂. Se trata de especies que viven en medios acuáticos o encharcados, donde la concentración de este gas es baja. El efecto del CO₂ es el contrario del O₂, es decir, las semillas no pueden germinar se aumenta la concentración de CO₂.

Para que la germinación tenga éxito, el O₂ disuelto en el agua de imbibición debe poder llegar hasta el embrión. A veces, algunos elementos presentes en la cubierta seminal como compuestos fenólicos, capas de mucílago, macrosclereidas, etc. pueden obstaculizar la germinación de la semilla por que reducen la difusión del O₂ desde el exterior hacia el embrión.

Además, hay que tener en cuenta que, la cantidad de O₂ que llega al embrión disminuye a medida que aumenta disponibilidad de agua en la semilla.

A todo lo anterior hay que añadir que la temperatura modifica la solubilidad del O₂ en el agua que absorbe la semilla, siendo menor la solubilidad a medida que aumenta la temperatura.

Luz

La luz es un factor imprescindible para la germinación de semillas, hay semillas activas de muchas especies que la necesitan para germinar, tras que germinan bajo una alternancia de luz-oscuridad y las que germinan en la oscuridad.

El mecanismo de acción de la luz se activa en la mayoría de las especies vegetales a través de un pigmento existente en las plantas llamado fitocromo.

1.4 Dormición de semillas

La mayoría de las semillas entran en un periodo de latencia (o inactividad metabólica) después de su completa maduración. En este periodo, la semilla pierde la mayor parte de la humedad que tenía. Y es precisamente esta sequedad (deshidratación) el factor principal que garantiza la viabilidad de la semilla y su capacidad para poner fin a la inactividad, crecer y convertirse en una nueva planta. Este periodo de latencia varía de especie a especie; algunas semillas mueren rápidamente si se secan demasiado, pero existen semillas de mucha antigüedad, que han germinado después de muchos cientos de años.

1.4.1 Concepto de dormición

Dormición, latencia, inactividad y letargo son sinónimos. Es la incapacidad de algunas semillas viables para germinar bajo condiciones ambientales apropiadas para que se dé su germinación, incapacidad que se perderá después de un período de tiempo más o menos largo. La dormición fisiológica de las semillas (Baskin y Baskin, 2004; Karlsson y Milberg, 2008) y la cubierta permeable (Moreira et al., 2010) son características de la familia de las lamiáceas.

Según Harper (1977) se denomina dormición o letargo al estado en el cual las semillas permanecen viables en el suelo sin germinar.

- Tipos de dormición

Dormición primaria: es inducida sobre la planta madre durante la maduración de la semilla.

Dormición secundaria: después de la dispersión de la semilla, inducido por ciertas condiciones de estrés o por un ambiente desfavorable a la germinación. Generalmente está sujeta a ciclos anuales (semillas de malezas).

Dormición absoluta: Nivel extremo de dormición, no se da la germinación a ninguna temperatura de incubación.

Dormición relativa: La condición de dormición se expresa solamente en determinados rangos de temperatura que tienen que ver con cambios a nivel de membranas celulares.

1.4.1.1 Causas de la dormición

La clasificación que hacen Pérez García et al. (1993) de las clases de dormición es la siguiente:

- a. Inmadurez del embrión
- b. Restricciones mecánicas para el desarrollo del embrión
- c. Requerimientos especiales de luz y/o temperatura
- d. Impermeabilidad de la cubierta de la semilla al agua o a los gases
- e. Presencia de sustancias inhibidoras

Dicho autor hace una clasificación, coincidiendo con otros autores en dos categorías fundamentales:

1. Dormición impuesta por las cubiertas seminales

Se manifiesta solamente en la semilla intacta y el embrión aislado puede germinar con normalidad (efecto de la escarificación: eliminación total o parcial de las cubiertas seminales)

1.1 Interferencia en la captación de agua

La impermeabilidad de las cubiertas seminales al agua impide que se realice la primera fase de la germinación, llamada fase de hidratación o imbibición; siendo esta una de las principales causas de la dormición.

La presencia de cubiertas impermeables al agua es una constante en determinadas especies, incluso en determinadas familias como papilionáceas, gramíneas, malváceas, cannáceas, solanáceas, leguminosas, etc.

1.2 Interferencia con el intercambio gaseoso

La presencia de las diferentes capas de tejidos que rodean el embrión puede dificultar el intercambio gaseoso de este con el exterior y dificultar la entrada de oxígeno.

Un bajo coeficiente de difusión del oxígeno a través de la cubierta se debe:

- a. A la presencia de una capa mucilaginosa sobre la cubierta seminal.
- b. Al consumo de oxígeno de los diferentes componentes de la propia cubierta, reduciéndose de este modo la cantidad de oxígeno que pasa a su través.

1.3 Presencia de inhibidores en la cubierta

Son anejos al embrión en determinadas especies vegetales, lo que no está tan claro es que sean las causantes de este tipo de dormición. El inhibidor más estudiado es el ácido abscísico (ABA), pero aún así ni se puede afirmar tajantemente que cause dormición su presencia exógena o endógena.

1.4 Impedimentos para la salida de inhibidores

Los inhibidores también aparecen en los tejidos internos de algunas semillas, además de en sus cubiertas; cuando esto sucede y las cubiertas impiden su salida al exterior, la dormición se mantiene debido a la alta concentración de inhibidores endógenos.

1.5 Restricciones mecánicas

Las cubiertas seminales o endospermo pueden ejercer una restricción mecánica a la expansión de la radícula: semilla dura.

Mediante la escarificación total o parcial se elimina esta restricción.

2. Dormición embrionaria

El embrión aun siendo viable y maduro es incapaz de germinar inclusive si se aísla del resto de la semilla y se pone en condiciones favorables para la germinación. De ello se deduce que la dormición embrionaria depende exclusivamente del embrión y es debida a la presencia de sustancias inhibitoras de la germinación en los tejidos del embrión.

De los inhibidores conocidos el más generalizado es el ácido abscísico (ABA), otros son la cumarina y diversos compuestos fenólicos.

1.4.1.2 Métodos pregerminativos para vencer la dormición de semillas

Como es lógico, la técnica utilizada para <<romper>> la dormición de las semillas dependerá del tipo de dormición que presente. El problema, sin embargo, se complica en aquellas semillas que actúan conjuntamente dos o más factores causantes de la dormición. La salida de la latencia y la promoción de la germinación en condiciones no favorables es promovida por algunos tratamientos como el precalentamiento, iluminación, GA3, los cuales son efectivos en especies de la familia de las Laminaceae (Ellis et al., 1985; Takano et al., 1990). Entre las técnicas y tratamientos más frecuentes se pueden citar los siguientes:

a. Escarificación mecánica

En algunas especies las cubiertas seminales se pueden eliminar total o parcialmente sin dañar el embrión. En otros casos basta con provocar pequeños daños en las cubiertas mediante diversos sistemas: incisión, punzón, lijado, etc.

b. Escarificación ácida

En este tipo de tratamientos se sumergen las semillas en ácidos fuertes durante un periodo corto, generalmente se suele emplear ácido sulfúrico concentrado y periodos de pocos minutos. A veces se utilizan soluciones diluidas de ácidos y tiempos de inmersión más prolongados.

c. Tratamientos con calor

Se puede utilizar calor seco (estufa) y agua caliente. Cuando se utiliza calor seco se emplean temperaturas entre 50-100°C y diferentes tiempos de exposición, según el grosor de las cubiertas seminales. Si se emplea agua caliente se pueden utilizar diferentes temperaturas y periodos de inmersión.

d. Lixiviación

El lavado de semillas con agua o con diversas sustancias químicas (etanol, acetona, hipoclorito sódico, nitratos, ect.). Se utiliza frecuentemente cuando la semilla posee sustancias inhibidoras de la germinación en sus cubiertas (como compuestos fenólicos y ácido abscísico). Un tratamiento de inversión en agua durante 24-48 horas puede dar buenos resultados en la germinación.

e. Aplicación exógena de giberelinas

Antes de su siembra, las semillas se pueden sumergir en ácido giberélico (GA₃) de diferente concentración (generalmente entre 500-1000 mg/L) durante 24 horas, o bien, en condiciones de laboratorio, se puede sustituir el agua que se añade al sustrato de germinación por la correspondiente solución de GA₃. Este tratamiento suele dar buenos resultados cuando la dormición es causada por la presencia de sustancias inhibidoras de la germinación.

f. Estratificación fría

Las semillas de algunas especies (sobre todo arbóreas y arbustivas) son capaces de vencer su dormición cuando se las estratifica, durante periodos variables (casi siempre superiores a un mes) en un ambiente con un elevado contenido de humedad y baja temperatura (alrededor de los 5°C). Con esta estratificación, se tiende a imitar las condiciones naturales a las que se ven sometidas muchas semillas. Se suelen emplear sustratos como arena o vermiculita ya que mantienen bien la humedad con aportes periódicos de agua. Da buenos resultados en especies forestales.

CAPÍTULO II: OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

Las semillas de estas dos especies de *Teucrium* fueron recolectadas en 2015 de la sierra de la Fausilla en Cartagena, al amparo del convenio con la Autoridad Portuaria de Cartagena “Recolección y conservación de germoplasma de las especies vegetales protegidas de la sierra de La Fausilla”. Dicho convenio tuvo como finalidad la de garantizar por un lado, la permanente conservación *ex situ* tanto en el Banco de Germoplasma de la UPCT como en el Royal Botanical Gardens de Kew, como la disponibilidad de semilla para poder multiplicar las especies en caso de que fuera necesario para la restauración, mejora o incluso restitución de los hábitat afectados.

Tras su recolección en 2015, todos los lotes de semillas de ambas especies se testaron para comprobar su viabilidad y para conocer las condiciones óptimas de germinación. En el caso de *T. freynii*, solo germinaron el 36% de las semillas incubadas a la temperatura alterna de 12/20°C y fotoperiodo de 12 horas luz, condiciones óptimas de germinación según la bibliografía consultada en su momento, mientras que apenas lo consiguieron el 5% de las semillas de *T. carthaginensis*. Estos resultados indicaron que las semillas de las dos especies de *Teucrium* presentaban algún fenómeno de letargo que impedía su germinación.

Por ello, el objetivo del presente proyecto trata del estudio de las técnicas más adecuadas para romper la dormición de las semillas de *T. freynii* y *T. carthaginensis*, con vistas a obtener una rápida y uniforme germinación. Se estudiarán tanto técnicas de escarificación como de estratificación y de aplicación de ácido gibérelico.

CAPÍTULO III: MATERIAL Y METODOLOGÍA

3. MATERIAL Y METODOLOGÍA

3.1 Material

Material vegetal

Para llevar a cabo los presentes estudios se han utilizado semillas de *Teucrium carthaginensis* y *Teucrium freynii* pertenecientes a la “Colección Autoridad Portuaria de Cartagena” del Banco de Germoplasma del Departamento de Producción Vegetal de la ETSIA, de la Universidad Politécnica de Cartagena.

3.2 Metodología

Se han estudiado las siguientes técnicas para romper la dormición de las semillas:

- Adición de ácido giberélico (GA₃)
- Golpe de calor seco durante 3 minutos
- Golpe de calor seco durante 5 minutos
- Estratificación fría (4°C) durante **78** días
- Estratificación cálida (25°C) durante **78** días

Más un tratamiento control utilizado para comparar la germinación de las semillas que no han sido expuestas a ningún tratamiento pregerminativo de ruptura de la dormición.

Para cada una de las técnicas de ruptura de la dormición se realizó un ensayo de germinación posterior, para comprobar la eficacia de cada técnica. Las condiciones elegidas para los ensayos de germinación fueron las siguientes: una temperatura alterna de 12/20°C (en ensayos anteriores se había comprobado que era la temperatura óptima de germinación para ambas especies) y dos condiciones de fotoperiodo, uno de 12 horas luz/12 horas oscuridad y otro, en oscuridad continua.

Todos los ensayos fueron realizados en los laboratorios del departamento de Producción Vegetal de la ETSIA en la Universidad Politécnica de Cartagena.

El **primer ensayo** fue en noviembre de 2016, se realizó la selección de semillas de las dos especies de *Teucrium* para los diferentes ensayos de germinación que se iban a realizar. Para ello, se seleccionaron 400 semillas de *T. carthaginensis* y 400 de *T. freynii*. Previamente, las semillas tuvieron que ser desinfectadas con lejía diluida al 2%. En esta solución permanecieron unos 2 minutos y después se lavaron abundantemente con agua destilada.

Para cada especie, se hicieron lotes de 4 réplicas con 25 semillas en cada una de ellas, para cada uno de los diferentes tratamientos estudiados y condiciones de germinación.

Los lotes fueron los siguientes:

- Control (12 horas luz)
- Control (oscuridad continua)
- Ácido giberélico (AG₃) (12 horas luz)
- Ácido giberélico (AG₃) (oscuridad continua)
- Golpe de calor 3' (12 horas luz)
- Golpe de calor 3' (oscuridad continua)
- Golpe de calor 5' (12 horas luz)
- Golpe de calor 5' (oscuridad continua)

En noviembre, los lotes de <<golpe de calor 3' y 5' >> se introdujeron en una estufa a 95°C, aunque por pérdidas de calor al abrir la puerta solo se alcanzaron 88°C, y permanecieron el tiempo que cada uno de los lotes requería. Posteriormente, se prepararon los ensayos de germinación. Para ello, las semillas tratadas con calor se colocaron en placas Petri (4 réplicas de 25 semillas cada una) sobre papel de filtro humedecido, con 4 ml de agua destilada.

Para el tratamiento de adición de ácido giberélico, se realizó una disolución a 500 ppm de GA₃.

$$\begin{array}{l} 1000\text{ml} \text{ ————— } 500 \text{ mg GA}_3 \\ 100 \text{ ml} \text{ ————— } x \end{array}$$

En lugar de regarse las semillas con agua destilada, se realizó con 5 ml de esta disolución.

Las semillas se incubaron a distintas condiciones de luz y temperatura en una cámara de germinación. La temperatura de la cámara fue de 12/20°C, estuvieron con un fotoperiodo de 12 horas de luz / 12 horas de oscuridad y en oscuridad continua.

En los tratamientos con periodo fluctuante, la temperatura más alta se alcanzó durante el periodo de luz, así como, la temperatura más baja se alcanzó durante la oscuridad.

En resumen, las semillas se distribuyeron de la siguiente forma:

- Control

25 semillas/placa x 4 réplicas (12 h luz) y 4 réplicas (Oscuridad continua) = 200 semillas/especie

- AG₃

25 semillas/placa x 4 réplicas (12 h luz) y 4 réplicas (Oscuridad continua) = 200 semillas/especie

- Golpe calor 3'

25 semillas/placa x 4 réplicas a (12 h luz) y 4 réplicas (Oscuridad continua) = 200 semillas/especie

- Golpe de calor 5'

25 semillas/placa x 4 réplicas a (12 h luz) y 4 réplicas (Oscuridad continua) = 200 semillas/especie

Las placas destinadas a los tratamientos con oscuridad continua, se cerraron con parafilm y envueltas con papel de aluminio para evitar el paso de la luz. Para el control de la germinación, el tratamiento con fotoperiodo de 12 horas luz, tuvo un recuento continuado cada 2-3 días, en el que se iba anotando el número de semillas que iban germinando, utilizando como criterio de germinación la aparición de unos 2 mm de radícula.

Las semillas que estuvieron en oscuridad continua, no tuvieron un recuento continuado como en el caso del fotoperiodo de 12 horas luz. En este caso, se hizo un recuento al final del ensayo de todas las semillas que habían germinado.



Figura 12. Ensayos de *T. carthaginensis* y *T. freynii*

Se estuvieron recogiendo datos por un periodo de 29 días, el cual se realizó los lunes, miércoles y viernes de cada semana, excepto de las placas que estaban en la oscuridad.

Una vez terminado el ensayo de germinación, se calcularon los porcentajes finales de germinación de cada tratamiento y el tiempo medio de germinación (TMG), índice que indica la velocidad de germinación de las semillas y que se obtiene calculando la media ponderada de las semillas germinadas de acuerdo a la siguiente fórmula:

$$\text{TMG (días)} = \frac{\sum(D \cdot n_D)}{\sum n}$$

D: días transcurridos desde el inicio del ensayo

n: número de semillas germinadas para cada valor de D

El **segundo ensayo** se realizó en mayo de 2017, en este caso se iba a utilizar la estratificación como técnica para romper la dormición de las semillas, para ello se hizo una estratificación fría y caliente de las dos especies, realizadas 78 días antes de poner los ensayos (marzo).

- Estratificación 4º (12 h luz)
- Estratificación 4º (oscuridad continua)
- Estratificación 25º (12 h luz)
- Estratificación 25º (oscuridad continua)

Estratificación fría (4°C).

Para ello, se seleccionaron 300 semillas de las dos especies de *Teucrium*, que tuvieran buena forma y color, y se almacenaron a 4°C, a dicha temperatura la probabilidad de que germinaran era muy baja. Las semillas se dispusieron en 6 placas Petri con 50 semillas en cada una de ellas.

Seguidamente, se introdujeron en la cámara frigorífica, todas ellas en oscuridad envueltas en papel de aluminio y con cierta humedad.

$$50 \text{ semillas/placa} \times 6 \text{ réplicas} = 300 \text{ semillas/especie}$$

Una vez transcurridos los 78 días, se procedió a la selección de semillas que se encontrasen en buen estado y sin germinar para llevar a cabo los ensayos de germinación, se tuvieron que seleccionar 200 semillas y se pusieron en placas de 25.

$$25 \text{ semillas/placa} \times 4 \text{ réplicas (12 h luz)} \text{ y } 4 \text{ réplicas (oscuridad continua)} = 200 \text{ semillas/especie}$$

Estratificación cálida (25°C).

En este caso, se seleccionaron 500 semillas por cada especie, aunque al igual que en el caso anterior solo se utilizaron 200, pero al tratarse de una estratificación cálida había más posibilidad de que las semillas germinaran. Por lo tanto, se dispusieron 10 placas en este caso.

$$50 \text{ semillas/ placa} \times 10 \text{ réplicas} = 500 \text{ semillas/especie}$$

Transcurridos los 78 días que estuvieron en una cámara a 25°C, tapadas con papel de aluminio a cierta humedad, se procedió a la selección de las semillas que se encontraban, al igual que en el caso anterior, en buen estado y sin germinar para llevar a cabo los ensayos de germinación. En este caso se seleccionaron también 200 semillas:

$$25 \text{ semillas/placa} \times 4 \text{ réplicas (Luz)} \text{ y } 4 \text{ réplicas (oscuridad)} = 200 \text{ semillas/especie}$$

Una vez que las semillas fueron colocadas en las placas respectivas, se puso a cada placa 4 ml de agua destilada, se cerraron con papel film y se llevaron a la cámara de 12/20°C las placas de fotoperiodo de 12 h luz. Por otro lado, se envolvieron en papel de aluminio las placas que iban a estar en oscuridad continua para evitar el paso de la luz, pero se pusieron en la misma cámara.

El tratamiento con fotoperiodo de 12 horas luz, tuvo un recuento continuado cada 2-3 días, se observó las semillas que iban germinando, para ello nos fijamos en que tuvieran unos 2 mm de radícula. Las semillas que estuvieron en oscuridad, no tuvieron un recuento continuado como en el caso del fotoperiodo de 12 horas luz. En este caso, se hizo un recuento al final del ensayo de todas las semillas que habían germinado.

Se estuvieron recogiendo datos, al igual que en el primer ensayo, un periodo de 29 días. Dicha recogida se realizó los lunes, miércoles y viernes de cada semana, excepto de las placas que estaban en la oscuridad.

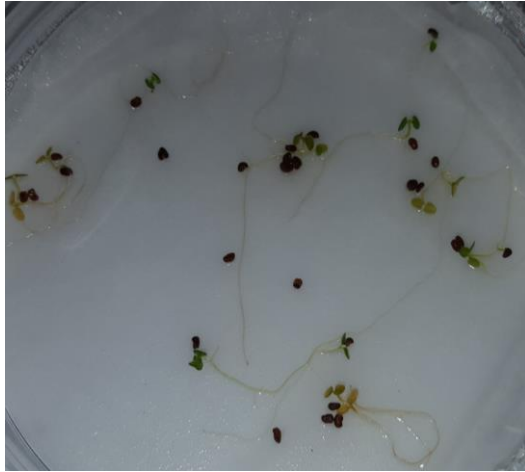


Figura 13. Semillas germinadas de *T. freynii*



Figura 14. Semillas germinadas de *T. carthagenensis*

Una vez terminado el ensayo de germinación, al igual que en el primer ensayo, se calcularon los porcentajes finales de germinación de cada tratamiento y el tiempo medio de germinación (TMG), índice que indica la velocidad de germinación de las semillas y que se obtiene calculando la media ponderada de las semillas germinadas de acuerdo a la siguiente fórmula:

$$\text{TMG (días)} = \frac{\sum(D \cdot n_D)}{\sum n}$$

D: días transcurridos desde el inicio del ensayo

n: número de semillas germinadas para cada valor de D

Los datos se analizaron utilizando el paquete Staph Gr. Se realizó un análisis de varianza (ANOVA de dos factores) en el que se incluyeron la iluminación (luz/oscuridad) y los tratamientos (estratificación, calor y Ga3). Cuando las interacciones fueron significativas, se realizó una ANOVA simple de cada factor y las medias fueron separadas con la Prueba de Rango Múltiple de LSD (nivel significativo $P < 0.05$).

CAPÍTULO IV: RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Comportamiento germinativo de *Teucrium freynii*

4.1.1 Porcentaje de germinación

Una vez finalizados los ensayos, se obtuvieron los porcentajes de germinación de cada uno de los tratamientos utilizados para romper la dormición y del tratamiento control, tanto en las semillas incubadas con un fotoperiodo de 12 h luz como en oscuridad continua. Todos los porcentajes se sometieron a un análisis ANOVA bifactorial (con dos factores: tratamiento utilizado para romper la dormición y fotoperiodo), que demostró que solo el factor tratamiento afectó de forma significativa a la germinación (Tabla 1), así como la interacción entre los dos factores estudiados. Por el contrario, el fotoperiodo no afectó significativamente a la germinación de la especie (Tabla 1).

Tabla 1. Factores que afectan a *Teucrium freynii*

EFECTOS PRINCIPALES <i>T.FREYNII</i>		
	Razón-F	P-value
A:tratamiento	18	0,0000
B:fotoperiodo	2,83	0,1014
AB	14,59	0,0000

Al haber interacción entre los dos factores estudiados, se realizó otro análisis estadístico mediante un ANOVA unifactorial para ver como afectaban los distintos tratamientos a la germinación de las semillas en función del fotoperiodo utilizado en la incubación. Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 2.

Tabla 2. Efecto de los tratamientos utilizados para romper la dormición de las semillas y del fotoperiodo utilizado en la incubación sobre la germinación de *Teucrium freynii* (porcentaje de germinación \pm desviación típica). Letras mayúsculas diferentes para valores dentro de una fila y letras minúsculas diferentes para valores dentro de una columna indican una diferencia significativa (LSD test; $p < 0.05$).

T.FREYNII				
Tratamiento	LUZ	OSCURIDAD	F	P
Control	55 \pm 2 abA	83 \pm 8,87 cdB	27,83	0,0019
GA3	66 \pm 16,49 bcA	95 \pm 7,57 dB	12,5	0,0131
Calor 3'	54 \pm 2,31 abA	68 \pm 16,33 cA	3,03	0,1325
Calor 5'	65 \pm 8,25 bcA	81 \pm 13,22 cdA	3,95	0,0939
Estratif 4°C	52 \pm 0 aA	23 \pm 8,87 aB	37,17	0,0009
Estratif 25°C	73 \pm 8,87 cA	44 \pm 10,33 bB	17,16	0,0061
F	3,78	19,22		
P	0,0162	0,000		

Como se puede observar, todos los tratamientos ensayados, excepto las aplicaciones de calor durante 3 minutos, muestran diferencias significativas entre los porcentajes de germinación obtenidos en semillas incubadas con un fotoperiodo de 12 horas luz y en oscuridad continua. Así, tanto en el tratamiento control como en el de adición de GA₃ la oscuridad continua favorece significativamente la germinación, 83% de germinación en oscuridad continua frente a 55% en luz en el tratamiento control y 95% en oscuridad continua frente a 66 % en luz en el tratamiento de adición de GA₃. Por el contrario, en los dos tratamientos de estratificación la oscuridad continua inhibe la germinación, obteniéndose mayores porcentajes de germinación en semillas expuestas a la luz, 23% en oscuridad continua frente a 52% en luz con la estratificación a 4°C y 44% en oscuridad frente a 73% en luz con la estratificación a 25°C (Tabla 2, Gráfica 1). Con los tratamientos pregerminativos de aplicación de calor durante 3 y 5 minutos, las condiciones de iluminación durante la incubación posterior de las semillas no afectaron de forma significativa a la germinación (Tabla 2).

Hay numerosos trabajos que afirman que la mayoría de semillas pequeñas necesitan la luz para obtener un alto porcentaje de germinación (Bewley y black, 1994). Este es el caso de las semillas de *Hypericum brasiliense* que en presencia de luz aumentaban el porcentaje de germinación comparado con la oscuridad (Faron et al., 2004). En contraste, Sales et al. (2004) observando el efecto de la luz y de la temperatura en las semillas de la labiada *Hyptis marrubioides* pudieron observar la presencia de protusión en las radículas en ausencia de luz y como consecuencia un menor porcentaje de germinación.

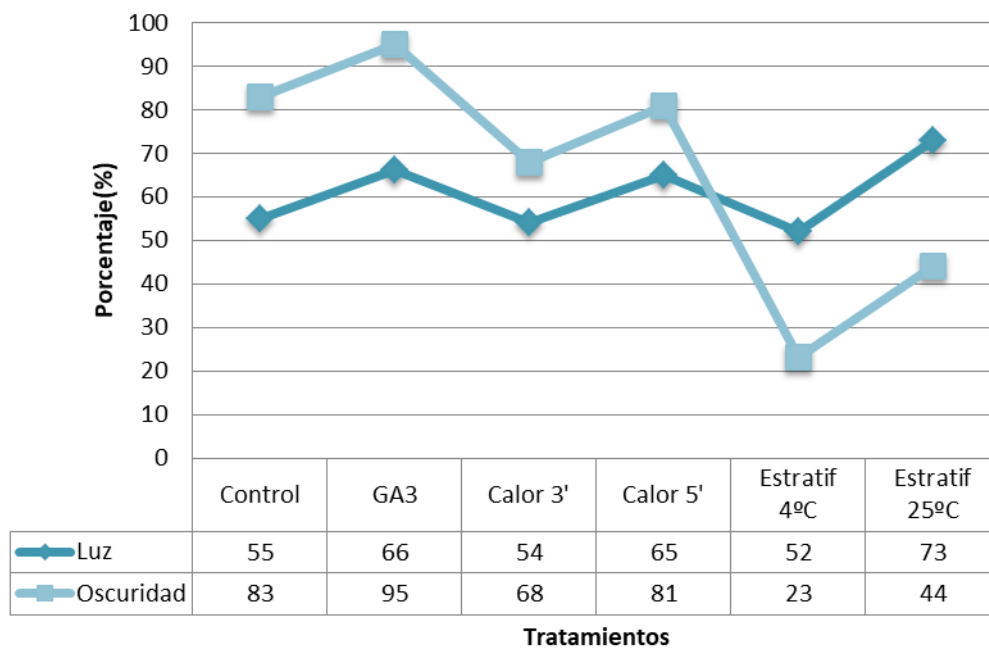


Figura 15. Diferencias de germinación de *Teucrium freynii* según el tratamiento utilizado para romper la dormición y las condiciones de iluminación durante la incubación de las semillas

Por otro lado, en las semillas expuestas a un fotoperiodo de 12 horas luz, el porcentaje de germinación fue significativamente afectado por los diferentes tratamientos aplicados, resultando el mayor valor con la estratificación a 25°C en la que se obtuvo un 73% de semillas germinadas, pero sin mostrar diferencias estadísticas con el tratamiento de calor durante 5' y el de adición de GA3 (Tabla 2, Gráfica 2). Evaluando las semillas de *Hypericum brasiliense* se pudo observar que la presencia de luz aumenta el porcentaje de germinación comparado con la oscuridad (Faron et al., 2004).

No obstante, solo la estratificación a 25°C logró mejorar de forma significativa el porcentaje de germinación obtenido en el tratamiento control.

Por contraposición, los valores de germinación obtenidos con la estratificación a 4°C fueron los más bajos (52 %), aunque sin diferencias significativas respecto a los de los tratamientos control y aplicación de calor durante 3' (55 y 54, respectivamente).

En el caso de *T. freynii*, bajo las condiciones de iluminación, los mejores tratamientos que han obtenido un alto porcentaje de germinación son la estratificación a 25°C, calor pregerminativo de 5 minutos y la adición de GA₃. El calentamiento se ve relacionado con una estrategia de supervivencia de las especies de cierta altitud para evitar la germinación en condiciones desfavorables (Fenner y Thompson, 2005).

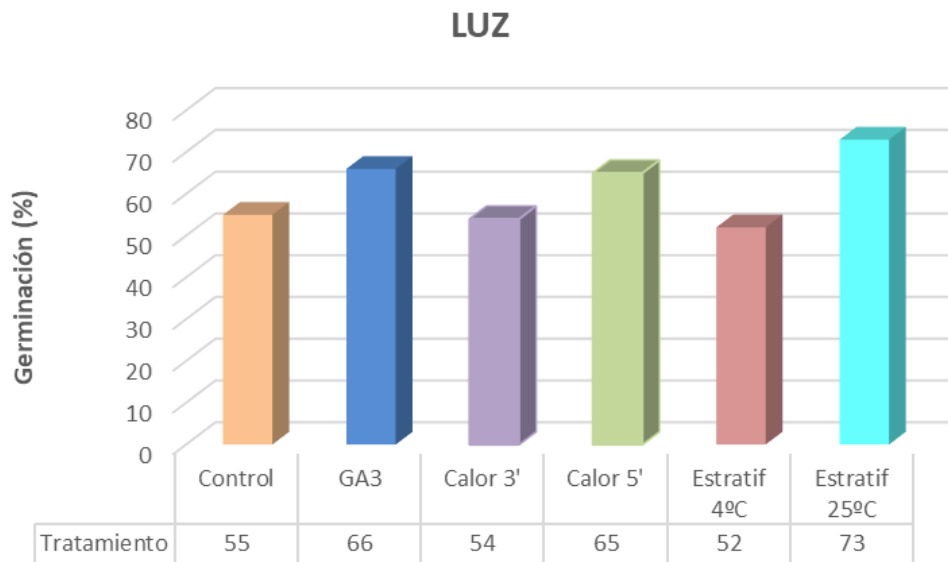


Figura 16. Efecto de los tratamientos utilizados para romper la dormición en el porcentaje de germinación de semillas de *Teucrium freynii* incubadas en condiciones de luz.

En cuanto a las semillas incubadas en oscuridad continua, el porcentaje de germinación también se vio afectado por el tipo de tratamiento utilizado, pero con resultados diferentes a los de las semillas expuestas a la luz mencionados anteriormente. El mayor porcentaje de germinación, un 95%, fue obtenido con el tratamiento de GA₃, aunque sin mostrar diferencias significativas con el valor obtenido en el tratamiento control y en el de aplicación de calor durante 5', 83 y 81 % respectivamente (Tabla 2, Gráfica 3). El resto de tratamientos no solo no mejoraron el porcentaje obtenido en el control, sino que incluso lo disminuyeron. El tratamiento de calor durante 3' redujo la germinación al 68 %, aunque sin diferencias significativas respecto al control, mientras que los dos tratamientos de estratificación fueron los que significativamente más la perjudicaron, obteniéndose un 44 y 23 % con la estratificación a 25 y 4°C, respectivamente. Como se puede observar, tanto en las semillas incubadas en oscuridad continua como en las expuestas a un fotoperiodo de 12 horas luz, los porcentajes más bajos de germinación se han obtenido con la estratificación previa de las semillas a 4°C (Tabla 2).

El efecto positivo de la adición de ácido giberélico en semillas incubadas en oscuridad no se ha observado en otras labiadas como *Minthostachys mollis*, donde las semillas de dicha especie obtuvieron un alto porcentaje de germinación con luz que contrastan con los bajos porcentajes obtenidos en oscuridad (Suárez et al., 2011). En oscuridad continua tuvo un alto porcentaje de germinación con la adición de GA₃. Por el contrario, en *Salvia Willeana*, la germinación se ve promovida en oscuridad continua por unas temperaturas de 20°C en precalentamiento o con adición de GA₃ (Kadis et al., 2009). Estos dos tratamientos, de acuerdo con Ellis et al. (1985), promueven de manera efectiva la germinación para las especies del género *Salvia*. Sin embargo, según Bras (2008), la oscuridad independientemente de la temperatura, disminuye el porcentaje de germinación.

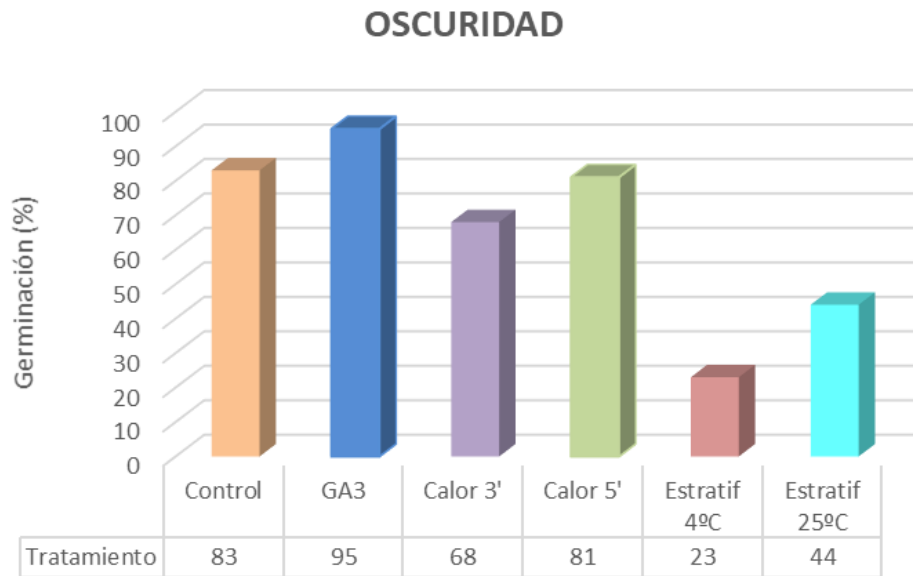


Figura 6. Efecto de los tratamientos para romper la dormición en el porcentaje de germinación de semillas de *Teucrium freynii* incubadas en condiciones de oscuridad continua.

4.1.2 Tiempo Medio de Germinación

En todos los tratamientos utilizados para romper la dormición de las semillas de *Teucrium freynii* y en el tratamiento control, el cálculo del tiempo medio de germinación, en adelante TMG, se realizó únicamente para las semillas expuestas a la luz (fotoperiodo de 12 horas luz), debido a que el tratamiento en oscuridad continua no fue interrumpido hasta el final del ensayo y por lo tanto solo han sido calculados los porcentajes de germinación. Una vez obtenidos los TMG se realizó un análisis estadístico con una ANOVA simple obteniéndose los resultados que se muestran en la tabla 3 y gráfica 4.

Tabla 3. Influencia de los diferentes tratamientos en los tiempos medios de germinación (días) de las semillas de *Teucrium freynii* (días \pm desviación típica). Letras minúsculas diferentes indican una diferencia significativa (LSD test; $p < 0.05$)

<i>T.FREYNII</i>	
Tratamiento	TMG
Control	21,92 \pm 0,75 c
GA3	21,95 \pm 0,16 c
Calor 3'	21,39 \pm 0,46 bc
Calor 5'	21,98 \pm 0,26 c
Estratif 4°C	20,22 \pm 0,63 a
Estratif 25°C	20,80 \pm 0,56 ab
F	8,12
P	0,0004

Como se puede observar en dicha tabla, los tratamientos revelan una influencia significativa en los tiempos de germinación, el menor TMG pertenece al tratamiento de estratificación a 4°C, con un tiempo medio de 20,22 días, aunque sin diferencias significativas respecto a la estratificación a 25°C (20,8 días). Sin embargo, muestra diferencias significativas con el resto de tratamientos, los cuales superan los 21 días para germinar.

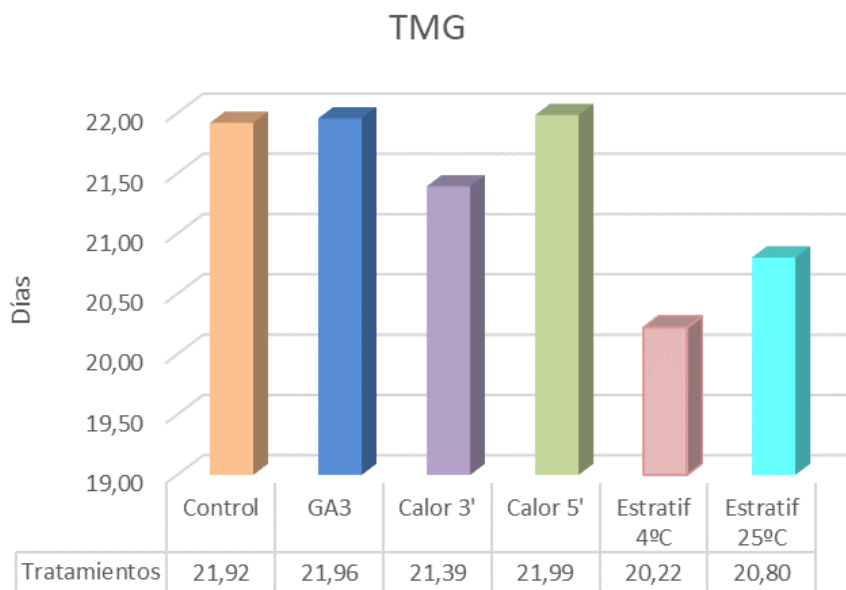


Figura 18. Efecto de los tratamientos para romper la dormición en el tiempo medio de germinación de semillas de *Teucrium freynii* incubadas en fotoperiodo de 12h luz.

4.2 Comportamiento germinativo de *Teucrium carthagenensis*

4.2.1 Porcentaje de germinación

Como en el caso anterior, una vez finalizados los ensayos se obtuvieron los porcentajes de germinación de cada uno de los tratamientos utilizados para romper la dormición y del tratamiento control, tanto en las semillas incubadas con un fotoperiodo de 12h luz como en oscuridad continua. Todos los porcentajes se sometieron a un análisis ANOVA bifactorial (con dos factores: tratamiento para romper la dormición y fotoperiodo), que demostró que solo el factor tratamiento afectó de forma significativa a la germinación (Tabla 4), así como la interacción entre los dos factores estudiados. Por el contrario, el fotoperiodo no afectó significativamente a la germinación de la especie (Tabla 4).

Tabla 4. Factores que afectan a *Teucrium carthagenensis*

EFECTOS PRINCIPALES <i>T.CARTHAGENENSIS</i>		
	Razón-F	P-value
A:tratamiento	7,37	0,0001
B:fotoperiodo	0,75	0,3908
AB	5,79	0,0005

Al haber interacción entre los dos factores estudiados se realizó otro análisis estadístico mediante un ANOVA unifactorial para ver como afectaban los distintos tratamientos a la germinación de las semillas en función del fotoperiodo utilizado en la incubación. Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 5.

Tabla 5. Efecto de los tratamientos utilizados para romper la dormición de las semillas y del fotoperiodo utilizado en la incubación sobre la germinación de *Teucrium carthagenensis* (porcentaje de germinación \pm desviación típica). Letras mayúsculas diferentes para valores dentro de una fila y letras minúsculas diferentes para valores dentro de una columna indican una diferencia significativa (LSD test; $p < 0.05$).

<i>T.CARTHAGENENSIS</i>				
Tratamiento	LUZ	OSCURIDAD	F	P
Control	23 \pm 8,87 aA	38 \pm 16,81 bA	2,57	0,1602
GA3	35 \pm 11,49 abA	72 \pm 21,91 cB	7,75	0,0319
Calor 3'	32 \pm 3,26 abA	32 \pm 10,31 abA	0,00	0,9558
Calor 5'	24 \pm 12,65 aA	21 \pm 14,37 abA	0,14	0,7258
Estratif 4°C	40 \pm 11,77 bA	29 \pm 6,83 abA	2,60	0,1579
Estratif 25°C	32 \pm 0 abA	12 \pm 8,64 aB	16	0,0071
F	2,01	8,07		
P	0,1251	0,000		

Como se puede observar, solo existen diferencias significativas entre las semillas incubadas en luz o en oscuridad continua en los tratamientos de adición de GA₃ y estratificación a 25°C. En el tratamiento de adición de GA₃ la oscuridad continua favorece significativamente la germinación, 72% de germinación en oscuridad continua frente a 35%. Por el contrario, en el tratamiento de estratificación a 25°C la oscuridad continua inhibe la germinación, obteniéndose mayores porcentajes de germinación en semillas expuestas a la luz (12% en oscuridad continua frente a 32% en luz). En el resto de tratamientos, las condiciones de iluminación durante la incubación posterior de las semillas no afectaron de forma significativa a la germinación (Tabla 4).

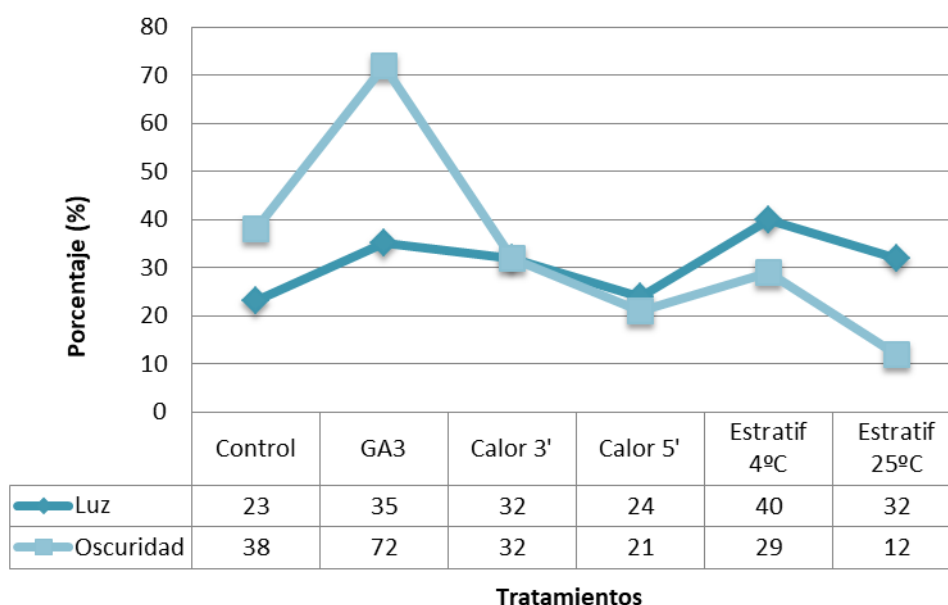


Figura 19. Diferencias de germinación de *Teucrium carthagenensis* según el tratamiento utilizado para romper la dormición y las condiciones de iluminación durante la incubación de las semillas.

Por otro lado, en las semillas incubadas con un fotoperiodo de 12 horas luz no hay diferencias significativas entre los distintos tratamientos utilizados para romper la dormición, no mejorando ninguno de ellos el porcentaje de germinación obtenido en el tratamiento control (Tabla 5, gráfica 7).

Por el contrario, en las semillas expuestas a oscuridad continua, el porcentaje de germinación fue significativamente afectado por los diferentes tratamientos aplicados, resultando el mayor valor con la adición de GA₃ (se obtuvo un 72% de semillas germinadas), mostrando diferencias estadísticas con el resto de tratamientos (Tabla 5, Gráfica 8).

Por contraposición, el valor más bajo de germinación lo obtuvo el tratamiento de estratificación a 25°C (12%), aunque no mostro diferencias significativas con la aplicación de calor durante 3 y 5 minutos y la estratificación a 4°C. Solo la estratificación a 25°C redujo el porcentaje de germinación respecto al tratamiento control.

Tratamientos con GA₃ han sido muy efectivos para romper la dormición de semillas de otras especies de *Teucrium* de las regiones mediterráneas, como *Teucrium polium* (Nadjafi et al., 2006) o *T. oxylepis ssp. marianum* (Herranz et al., 2002). En otras labiadas como *Hyptis pectinata*, Melo et al. (2002) estudió los efectos de la luz con la adición de GA₃, llegando a la conclusión de que la germinación con ausencia de luz (oscuridad continua) y GA₃ estimula la germinación de las semillas de esta especie. Sin embargo, en otras como *Satureja khuzistanica*, es el tratamiento de estratificación a 5°C durante un periodo de 7 días el que mejora el rango de la germinación, obteniendo un 55% comparado con el control (5%) (Afzalifar et al., 2015).

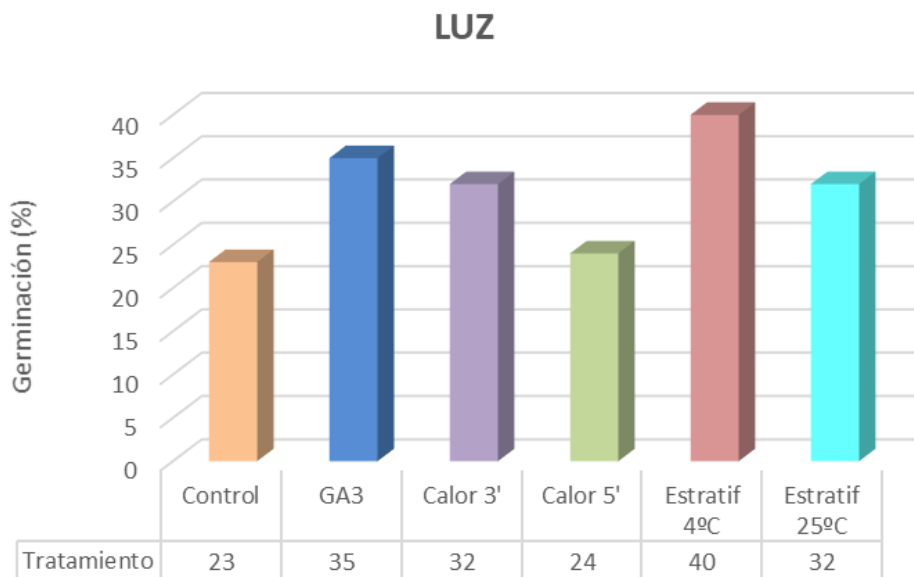


Figura 7. Efecto de los tratamientos para romper la dormición en el porcentaje de germinación de semillas de *Teucrium carthaginense* incubadas en fotoperiodo de 12h luz.

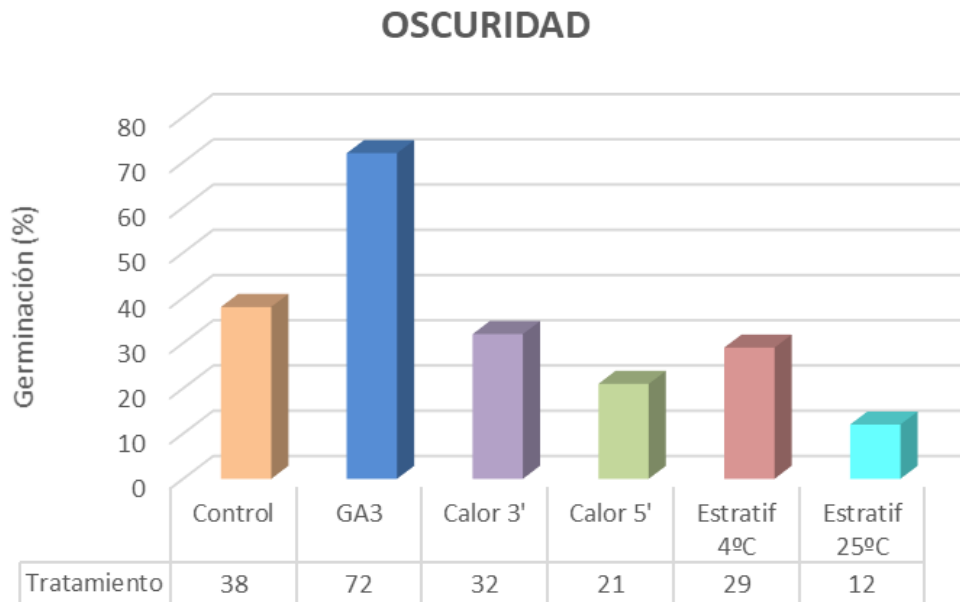


Figura 21. Efecto de los tratamientos para romper la dormición en el porcentaje de germinación de semillas de *Teucrium carthaginense* incubadas en oscuridad continua.

4.2.2 Tiempo Medio de Germinación

Como en el caso de *Teucrium freynii*, el cálculo del TMG se realizó únicamente para las semillas expuestas a la luz, debido a que el tratamiento en oscuridad continua no fue interrumpido hasta el final del ensayo y por lo tanto solo han sido calculados los porcentajes de germinación. Una vez obtenidos los TMG se realizó un análisis estadístico con una ANOVA simple obteniéndose los resultados que se muestran en la tabla 6 y en la gráfica 9.

Tabla 6. Influencia de los diferentes tratamientos de ruptura de la dormición en los tiempos medios de germinación (días) de las semillas de *Teucrium carthagenensis* (días \pm desviación típica). Letras minúsculas diferentes indican una diferencia significativa (LSD test; $p < 0.05$).

T. CARTHAGENENSIS	
Tratamiento	TMG
Control	25,86 \pm 1,19 c
GA3	24,1 \pm 1,56 bc
Calor 3'	24,63 \pm 0,96 bc
Calor 5'	22,75 \pm 1,15 b
Estratif 4°C	20,82 \pm 0,22 a
Estratif 25°C	20,67 \pm 1,71 a
F	10,68
P	0,0001

Como se puede observar en dicha tabla, los tratamientos revelan una influencia significativa en los tiempos de germinación, el menor TMG pertenece al tratamiento de estratificación a 25°C, con un tiempo medio de 20,67 días sin mostrar diferencias significativas con la estratificación a 4°C (20,82 días). Sin embargo, muestra diferencias significativas con el resto de tratamientos, el que más tarda en germinar es el control, alcanzando los 25,86 días.

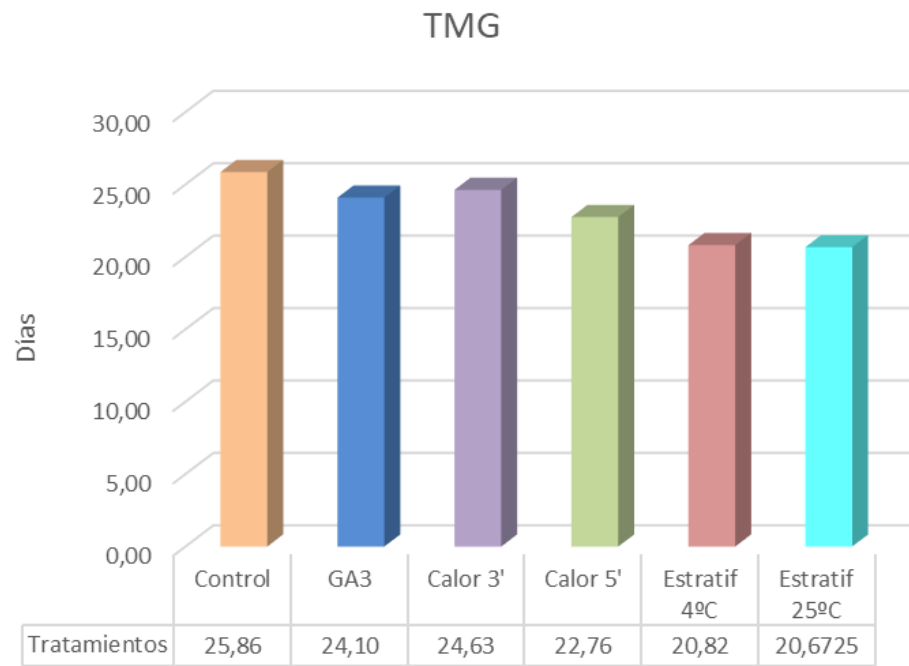


Figura 22. Efecto de los tratamientos de ruptura de la dormición en el tiempo medio de germinación de semillas de *Teucrium carthaginense* incubadas en fotoperiodo de 12h luz.

CAPÍTULO V: CONCLUSIONES

5. CONCLUSIONES

En vista de los resultados expuestos anteriormente podemos extraer las siguientes conclusiones del estudio realizado sobre las condiciones óptimas de germinación de dos especies del género *Teucrium*.

1. *Teucrium freynii* en condiciones de fotoperiodo de 12h de luz, mostró el mejor resultado con el tratamiento de estratificación a 25°C (73%) y el peor con la estratificación a 4°C (52%). Por otro lado, en oscuridad continua, la aplicación de GA₃ (95%) reveló un alto porcentaje de germinación, siendo el más bajo el de estratificación a 4°C (23%).

2. El tiempo medio de germinación (TMG) en *Teucrium freynii* obtuvo el mejor resultado con la estratificación a 4°C (20,22 días) y el peor el precalentamiento seco de 5 minutos (21,99 días).

3. El mejor tratamiento para romper la dormición y lograr el mayor porcentaje de germinación de las semillas de *T. freynii* es la adición de ácido giberélico seguido de la incubación en oscuridad continua.

4. *Teucrium carthagenensis* en condiciones de fotoperiodo de 12h de luz, mostró el mejor resultado de germinación con la estratificación a 4°C (40%), mientras que el peor, con el control (23%). Por otro lado, en oscuridad continua, el tratamiento de GA₃ (72%) desveló el porcentaje de germinación mayor, mientras que el menor se obtuvo con la estratificación a 25°C (12%).

5. En cuanto al tiempo medio de germinación, el mejor resultado se obtuvo con el tratamiento de estratificación a 25°C (20,67 días), y el peor se obtuvo con el control (25,86 días).

6. Al igual que en *T. freynii*, el mejor tratamiento para romper la dormición y lograr el mayor porcentaje de germinación de las semillas de *T. carthagenensis* es la adición de ácido giberélico seguido de la incubación en oscuridad continua.

CAPÍTULO VI: REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

6. BIBLIOGRAFÍA

- Afzalifar, M, Hasan Ghorbani Ghozhdi, Maryam Pezhmanmehr, J. Hadian. 2015. Seed germination improvement of *Satureja khuzistanica* and *S. rechingeri* (Lamiaceae) as valuable endemic medicinal species from Iran. vol.7, No 2, p. 93-99.
- Baskin, J.M and Baskin, C.C. 2004. A classification system for seed dormancy. Seed Science Research 14, 1-16.
- Bewley, J.D., Black, M. 1994. Seeds Physiology of development end germination. New York: Plenum press, p. 445
- Bras, R., Antônio Lucrecio Dos Santos Neto, Sebastião Modeiros Filho, Elizita Maria Teófilo, Renato Mendes Guimaraes, Arie Fitzgerald Blank, Renata Silva-Mann .2008. Influence of light and temperatura in the germination of *Hyptis pectinata* (L.) Poit SEEDS. vol. 14, n 4-4, p. 19-26.
- Castroviejo. 2010. S. Flora ibérica. Verbenaceae-Labiatae-Callitrichaceae vol. 12.
- Harper, J.L. 1977. Population Biology of Plants. Academic Press, London.
- Kadis Costas, Kounnamas Constantinos and Kyriakos, 2009. Seed germination and conservation of endemic, rare, and threatened aromatic plants of Cyprus. Israel Journal of Plants Sciences, vol. 58, p.251-261.
- Decreto 50/2003, de 30 de mayo por el que se crea el Catálogo Regional de Flora Silvestre Protegida de la Región de Murcia y se dictan normas para el aprovechamiento de diversas especies forestales (BORM núm. 131, de 10 de junio de 2003).
- Ellis, R.H., Hong, T.D., Roberts, E.H. 1985. Handbook for genebanks: No 3. Handbook of seed technology for genebanks. Vol. II. Compendium of specific germination information and test recommendations, International Boards for Plant Genetic resources, Rome.
- Faron, M.L.B., Perecin, M.B., Lago, A.A., Bovi, O.A., Maia N.B. 2004. Temperatura, nitrato de patássio e fotoperíodo na germinação de sementes de *Hypericum perforatum* L. e *H. brasiliense* Choisy. Bragantia, Campinas, v.63, n.2, p. 193-199.
- Fenner, M., Thompson, K. 2005. The ecology of sedes. Cambridge, Cambridge University Press.
- Herranz, J.D., Ferrandis P., Copete M.A., Martinez-Sanchez, J.J. 2002. Influence of incubation temperatura on germination of 23 Iberian or North African-Iberian plant endemics. Investigacion Agraria 17: 229-245
- Karlsson, L.M. and Milberg, P. 2008. Variation within species and inter.species comparison of seed dormancy and germination of four anual *Lamium* species. *Flora-Morphology, Distribution, Funcional Ecology of Plants* 203, 409-420.

Lista Roja de la Flora Vasculare Española 2008. Actualización con los datos del Adenda 2010 al Atlas y Libro Rojo de la Flora Vasculare Amenazada. MORENO, J.C., coord. (2011). Dirección General de Conservación de la Naturaleza y Sociedad Española de Biología de la Conservación de Plantas. Madrid. 46 pp.

Melo, D.L.F.M., Pereira, R.C.S., Arrigoniblanck, M.F., Blanck, A.F., Barbosa Junior, A.M., Silvia-Mann, R. 2002. Influência da luz e do ácido giberélico na germinação sementes de sambacaita (*Hyptis Pectinata* L. Poit) Horticultura Brasileira, Brasília, v. 20, n.2, p.1-4.

Moreira, B., Tormo, J., Estrelles, E. and Pausas, J.G. 2010. Disentangling the role of heat and smoke as germination cues in Mediterranean Basin flora. *Annals of Botany* 105, 627-635.

Nadjafi F, Bannayan M, Tabrizi L, Rastgoo M. 2006. Seed germination and dormancy breaking techniques for *Ferula gummosa* and *Teucrium polium*. *Journal of Arid Environments* 64, 542-547.

Pérez Cavas, M.J. 2004. Proyecto fin de carrera: "Estudio de la germinación y uso de reguladores del crecimiento en *Lagurus ovatus*, L." p. 14-30.

Pérez García, F., Pita Villamil, M.J. y Gómez Campo, C. 1993. Fisiología de Semillas. E.T.S. Ingenieros agrónomos. Universidad Politécnica de Madrid.

Sales, J.F., Pinto, J.E.B.P., Oliveira, J.A., Botrel, P.P, Silvia, F.G, Bertolucci, S.K.V. 2004. Influencia da luz, temperatura e armazenamento na germinação de hortelã-do-campo (*Hyptis marruboides*) Horticultura Brasileira, Brasília, v.22, n.1, p. 1-4. Suplemento 2.

Suárez, Diego M. Sc, Fernández Alonso, Jose Luis, Ph. D., Marina Melgarejo, Luz , Ph. D. 2011, Efecto de la luz y del ácido giberélico (AG₃) en la germinación de *Minthostachys mollis* KUNTH. GRISEB. (LABIATAE).

Sükrü Serter Catav, Köksal Küçükakyüz, Kenan Akbas and Cagatay Tavsanoğlu. 2014. Smoke-enhanced seed germination in Mediterranean Lamiaceae. vol.24, p. 257-264.

Takano, T., K., Kawabata, M. 1990. Germination characteristics of herb seeds in Labiatae. *Scientific Reports of the Faculty of Agriculture, MMeijo University, Japan.* 26: 17-24.

Páginas web consultadas

Descripción familia Lamiaceae

<https://es.wikipedia.org/wiki/Lamiaceae>

Periodo de latencia o letargo de las semillas

<https://es.scribd.com/doc/43240117/Periodo-de-Latencia-o-Letargo-de-Las-Semillas>

Universidad Politécnica de Valencia, área de biología.

http://www.euita.upv.es/varios/biologia/Temas/tema_17.htm#Proceso de Germinación

