

## ***Seed dormancy break and germination of southeast Iberian endemic *Narcissus tortifolius****

**E.Martínez-Díaz, J.J.Martínez-Sánchez, M.J.Vicente**

Departamento de Producción Vegetal, Instituto de Biotecnología Vegetal, Universidad Politécnica de Cartagena. Paseo Alfonso XIII, 48, 30203 Cartagena, España.

E-mail: ely.martinez@hotmail.com

### **Resumen**

Muy pocos son los estudios sobre ruptura de latencia y germinación en semillas del género *Narcissus* dentro del grupo de las monocotiledóneas. El objetivo principal de este estudio fue determinar el tipo de latencia en *Narcissus tortifolius* y conocer los requerimientos para vencerla. El crecimiento del embrión y la germinación de las semillas fueron estudiados bajo test de estratificación fría (5°C) y cálida (25°C) durante 60 días y post-incubación de las semillas a diferentes temperaturas (5, 10, 15, 20, 25 y 20/12°C) que se ensayaron tanto con 12 horas de luz como en oscuridad permanente, durante 30 días. La longitud media del embrión en semillas frescas fue de 1,77 mm. Los embriones completaron su desarrollo cuando se sometieron a una estratificación cálida y las semillas germinaron en todos los rangos de temperatura alcanzándose los mayores valores de germinación a 15°C/ luz (95%). Sin embargo, los embriones crecieron solamente un poco en semillas estratificadas en frío que solo germinaron un 3% de las incubadas a 15°C/oscuridad. Se concluye que las semillas de *Narcissus tortifolius* tienen una latencia morfológica y que para romper la misma es necesario una estratificación cálida.

**Palabras clave:** Capacidad germinativa; crecimiento del embrión; estratificación.

### **Abstract**

There are few studies on seed dormancy/germination in the large monocot genus *Narcissus*. A primary aim of this study was to determine the kind of seed dormancy in *Narcissus tortifolius* and relate the dormancy breaking. Embryo growth and seed germination were studied under test cold stratification (5°C) and warm stratification (25°C) for 60 days and post incubation of seeds at different temperatures (5, 10, 15, 20, 25 y 20/12°C). At each temperature, seeds were incubated at 12h/12 h light/dark regime and in continuous darkness, for 30 days. Mean embryo length in fresh seeds was 1,77 mm. Embryos grew to full size when they were warm stratified and seed germinated in all temperature ranges reaching the highest values de germination at 15°C/light (95%). However, the embryos grew only slightly in cool stratified seeds germinated only 3% of the incubated at 15°C/darkness. We conclude that the seed of *Narcissus tortifolius* have a morphological dormancy and break it warm stratification is necessary.

**Keywords:** Germination capacity; embryo growth; stratification.

### **1. Introducción**

Las semillas de muchas especies de plantas de zonas templadas son latentes en el momento de la dispersión, y unos requerimientos específicos de temperatura deben darse para que puedan salir de la latencia y germinar [1]. La latencia previene la germinación en momentos en que las condiciones son adecuadas para germinar, pero con escasa probabilidad de éxito para el establecimiento de las plántulas [2]. Por lo tanto, la latencia es un rasgo adaptativo que optimiza la emergencia de las mismas a lo largo del tiempo.

Así, el conocimiento de los mecanismos de ruptura de la latencia de una especie es un factor

importante a la hora de diseñar protocolos de propagación ex-situ para reforzar las poblaciones de la especie objeto de estudio.

De acuerdo con Baskin y Baskin [1], la familia **Amaryllidaceae** tiene embriones lineares subdesarrollados que son plenamente diferenciados, así ellos necesitan crecer antes de que las semillas puedan germinar. Sin embargo, datos sobre los requerimientos para el crecimiento del embrión son particularmente escasos en esta familia.

El género *Narcissus* L. pertenece a la familia de monocotiledóneas Amaryllidaceae, la cual incluye unas 900 especies dentro de 60 géneros

[3]. *Narcissus tortifolius* Fern. Casas está catalogada como “Vulnerable” en el Catálogo Regional de Flora Silvestre Protegida de la Región de Murcia (BORM 50/2003) y sus poblaciones se encuentran en las sierras litorales de Cartagena (La Azohía, Isla Plana, Sierra del Puerto) y en los cabezos de las inmediaciones de Fuente Álamo.

Con este trabajo se pretende mejorar el conocimiento sobre las condiciones que posibilitan el crecimiento del embrión, así como la germinación, en especies con embriones subdesarrollados.

Por consiguiente, los objetivos de este estudio son 1) efecto de la temperatura sobre el crecimiento del embrión y 2) influencia de la temperatura de estratificación y condiciones de iluminación sobre la capacidad germinativa de las semillas a diferentes temperaturas.

## 2. Materiales y Métodos

### 2.1 Material vegetal

Las plantas de *Narcissus tortifolius* pueden alcanzar 40 cm de altura con bulbos de 1 x 4,6 cm de diámetro, que presentan numerosas tunicas (restos basales de las hojas de años anteriores). Hojas de hasta 40 cm de longitud y 0,7 cm de anchura, planas, retorcidas sobre sí mismas [4]. El escapo de 4-20 cm algo comprimido y liso, que puede tener de 2-10 flores con tépalos y corona de color blanco [5]. Su fruto es una cápsula que puede tener de hasta 50 semillas. Esta especie forma parte de matorrales, espartizales y tomillares, sobre diversos sustratos (arcillas de descalcificación, calizas y filitas) en suelos generalmente poco desarrollados.

### 2.2 Efecto de la temperatura sobre el crecimiento del embrión

Las semillas que se utilizaron para llevar a cabo los ensayos fueron recolectadas de la población de Fuente Álamo.

En primer lugar, se midió la longitud media del embrión en 23 semillas recién recolectadas colocadas en una placa Petri de 9 cm durante 24 h, sobre dos capas de papel de filtro húmedo con agua destilada. Los embriones fueron extraídos de semillas embebidas con un bisturí y sus longitudes medidas usando una lupa equipada con un micrómetro. Este tratamiento es el control 0.

A continuación se colocaron 24 semillas por placa sobre dos capas de papel de filtro humedecido con agua destilada y precintadas con Parafilm. Se

utilizaron dos placas por tratamiento. Se llevaron a cabo los siguientes tratamientos: estratificación fría (5°C/húmeda) y estratificación caliente (25°C/húmeda) y un control en seco a 20°C. Las semillas se incubaron durante 60 días, y posteriormente semillas sanas fueron extraídas de cada temperatura y sus embriones extirpados y medidos. La longitud media y el error estándar fueron calculados en cada muestra de 25 embriones.

### 2.3 Influencia de la temperatura de estratificación y condiciones de iluminación sobre la capacidad germinativa de las semillas.

Para ello se prepararon 10 lotes (5 lotes con 12 h de luz/12 de oscuridad y 5 lotes en oscuridad total) de 4 placas cada uno con 25 semillas por placa para cada tratamiento de estratificación; fría/húmeda, cálida/húmeda y un control (T<sup>a</sup>ambiente/seco), que se incubaron durante 60 días y posteriormente cada lote a 5, 10, 15, 20, 25 y 20/12°C durante 30 días [1] en cámaras de germinación (Sanyo MLR-351H, Osaka, Japan) con control digital ( $\pm 0,1^\circ\text{C}$ , luz fluorescente blanca fría de 20000 lx). El recuento de las semillas germinadas se realizó cada 2 días en los tratamientos con fotoperiodo de 12 horas de luz, retirando de las placas las semillas que iban germinando. El criterio para decidir que se había producido la germinación fue la emergencia de la radícula. Para los tratamientos en condiciones de completa oscuridad las placas se taparon con 2 hojas de papel de aluminio y se contaron las semillas germinadas al final del ensayo.

### 2.4 Análisis estadístico

Un análisis multivariante de la varianza se utilizó para evaluar el efecto de la temperatura sobre el crecimiento del embrión y de la germinación de las condiciones utilizadas en cada ensayo. Los datos fueron analizados con el programa estadístico SPSS 19.0 para Windows (SPSS Inc. Chicago, EE.UU). La normalidad y la homocedasticidad de los datos fueron verificados, y los porcentajes de germinación se transformaron en arcoseno. Cuando los efectos principales eran significativos, las diferencias fueron probadas por la prueba de comparación múltiple de Tukey a  $P \leq 0,05$ .

## 3. Resultados y Discusión

Las semillas de *N. tortifolius* recién recolectadas tienen un embrión subdesarrollado en el momento de la dispersión al final de la primavera. La longitud media del embrión es de

1,77±0,19 mm y tienen que crecer hasta alcanzar al menos 1,98±0,27 mm (Tabla 1) para ser susceptibles de germinar (momento en el cual se produce la emergencia de la radícula). Así, las elevadas temperaturas estivales proporcionan las condiciones apropiadas que conllevan a la germinación cuando las temperaturas descienden en otoño o al principio de invierno. Sin embargo, los embriones crecen poco 1,90±0,23 mm (Tabla 1)

Los resultados ponen de manifiesto que la estratificación fría durante 60 días y posterior incubación de las semillas en todos los regímenes de temperatura durante 30 días impidió la germinación de las mismas excepto a 10°C y 15°C en oscuridad, alcanzándose tan sólo 1 y 3%, respectivamente (Tabla 2).

La estratificación cálida durante 60 días favoreció significativamente la germinación en todas las temperaturas ensayadas, obteniéndose unos valores mayores a 20/12 y 15 °C en luz del 75 y 95% (Tabla 3), frente al 26 y 71% obtenido en el control con un 26 y 75% (Tabla 4) respectivamente.

En general, la oscuridad favoreció la germinación de las semillas en todas las temperaturas ensayadas excepto a 25 °C con respecto a la luz (Tabla 4) Del mismo modo ocurre cuando las semillas se someten a una estratificación cálida y posterior incubación a 10°C donde se puede observar que en oscuridad germinan más semillas que en luz, un 95% frente a un 51 % respectivamente. Este efecto de la luz implica que las semillas no sean susceptibles de germinar hasta ser enterradas, suponiendo una ventaja de cara a la supervivencia de las plántulas ya que en periodos de sequía serían menos vulnerables que aquellas que se encuentran en la superficie [6].

Por consiguiente, las semillas tienen latencia morfológica (LM), es decir, los embriones tienen que crecer dentro de las semillas maduras antes de que la germinación sea posible [1].

Desde un punto de vista ecológico, este nivel de latencia supone una excelente adaptación a regiones templadas [7;8;9]. Así, aunque la dispersión de la semilla se produce a principios de la primavera, la presencia de un embrión subdesarrollado y latente evita que la semilla pudiera germinar tras una tormenta de verano, que si bien le aportaría una cierta humedad inicial, el estrés hídrico estival acarrearía la muerte de las semillas germinadas. De este modo, la germinación se retrasa hasta otoño,

momento en el que las condiciones de humedad son más propicias para la supervivencia.

#### 4. Conclusiones

Para la producción de plantas a partir de semillas es necesario romper la latencia de las mismas en cámaras de germinación sometiendo a un periodo de estratificación cálida durante 60 días con el fin de vencer la situación en el campo.

#### 5. Agradecimientos

Agradecer la estimable ayuda técnica ofrecida por mi compañera y gran amiga Naveira, D., así como a Macarena y José Luis.

#### 6. Referencias bibliográficas

- [1] Baskin CC., Baskin JM. 1998. Seeds: Ecology, biogeography, and evolution of dormancy and germination. San Diego, CA: Academic Press.
- [2] Bewley JD., Black M, Halmer P. 2006. The encyclopedia of seeds: science, technology y uses. Oxon, Wallingford, UK. CAB International.
- [3] Mabberley DJ. 2008. Mabberley's plant-book. A portable dictionary of plants, their classifications, y uses. (3<sup>rd</sup>ed.). New York. Cambridge University Press.
- [4] Carrión Vilches, MA., Sánchez-Gómez, P., Hernández González, A., Guerra, J. 2002. Datos sobre la biología de *Narcissus tortifolius* Fern. Casas (Amaryllidaceae), endemismo del sureste de la Península Ibérica. Anales de Biología 24: 115-120.
- [5] Barra, A., Blanco, E., Grijalbo, J. 2011. Narcisos ibéricos: junquillos, campanillas, capirotos o trompones. Revista Quercus 301: 40-52.
- [6] Thanos, CA., Georghiou, K., Douma, DJ., Marangaki, CJ. 1991. Photoinhibition of seed germination in Mediterranean maritime plants. Annals of Botany 68: 469-475.
- [7] Baskin CC., Baskin JM. 1983. Germination ecophysiology of the eastern deciduous forest herbs: *Hydrophyllum macrophyllum*. The American Midland Naturalist 109: 63-71.
- [8] Baskin CC., Baskin JM. 1985. Germination ecophysiology of *Hydrophyllum appendiculatum*, a mesic forest biennial. American Journal of Botany 72: 185-190.
- [9] Kondo, T., Miura, T., Okubo, N., Shimada, M., Baskin, C.C., Baskin, JM. 2004. Ecophysiology of deep simple epicotyl morphophysiological

dormancy in seeds of *Gagea lutea* (Liliaceae).  
Seed Science Research 14: 371- 378.

### Tablas y Figuras

#### 1. Efecto de la temperatura de estratificación sobre la longitud del embrión

Tratam.	Longitud embrión (mm)
Control 0	1,77± 0,19b
Estrat. 4°C	1,90±0,23ab
Estrat.25°C	1,98±0,27c
Control 20°C	1,58±0,20a

\* Letras diferentes para valores dentro de una columna indican diferencia significativa (Test Tukey; P<0,05)

**Tabla 2.** Efecto de la temperatura y fotoperiodo sobre la germinación de semillas sometidas a una estratificación fría

Tª	%Germinación	
	Luz	Oscuridad
10°C	0±0,00aA	1±2 abB
15°C	0±0,00aA	3±2 bB
20°C	0±0,00aA	0±0,00aA
25°C	0±0,00aA	0±0,00aA
20/12°C	0±0,00aA	0±0,00aA

\* Letras diferentes en mayúsculas con los valores dentro de una columna indican diferencias significativas entre sí, y las diferentes letras minúsculas para los valores dentro de una fila indican una diferencia significativa (Test Tukey; P<0,05)

**Tabla 3.** Efecto de la temperatura y fotoperiodo sobre la germinación de semillas sometidas a una estratificación cálida (°C)

Tª	%Germinación	
	Luz	Oscuridad
5°C	50±10,07bA	22±4,00aB
10°C	51±8,87bA	95±6,00cB
15°C	95±5,03cA	89±6,83bcA
20°C	4±5,66aA	8±4,62aA
20/12°C	75±7,57bA	73±19,97bA

\* Letras diferentes en mayúsculas con los valores dentro de una columna indican diferencias significativas entre sí, y las diferentes letras minúsculas para los valores dentro de una fila indican una diferencia significativa (Test Tukey; P<0,05)

**Tabla 4.** Efecto de la temperatura y fotoperiodo sobre la germinación de semillas sometidas a una estratificación a 22°C (Tª ambiente)

Tª	%Germinación	
	Luz	Oscuridad
10°C	32±8,64bA	81±3,83dB
15°C	71±6,00cA	93±6,00eB
20°C	2±2,31aA	28±9,80bB
25°C	0±0,00aA	0±0,00aA
20/12°C	26±8,33bA	55±6,83cB

\* Letras diferentes en mayúsculas con los valores dentro de una columna indican diferencias significativas entre sí, y las diferentes letras minúsculas para los valores dentro de una fila indican una diferencia significativa (Test Tukey; P<0,05)