

Sobre la germinación de Ononis viscosa L. subsp. porrigens Ball

David García Alonso & Francisco Márquez García

Grupo de investigación HABITAT. Departamento de Producción Forestal y Pastos. Sección Producción Forestal y Biodiversidad. Centro de Investigación La Orden-Valdesequera. Consejería de Empleo, Empresa e Innovación. Gobierno de Extremadura. Apartado de Correos 22. 06080. Badajoz (España).
email: david.garcia@gobex.es

Resumen:

Ononis viscosa L. subsp. *porrigens* Ball, taxon ibero-magrebí presenta una distribución muy escasa en Extremadura, con un par de poblaciones conocidas actualmente. De cara a la conservación de sus propágulos en un banco de germoplasma es necesario monitorizar la viabilidad y vigor de sus semillas con carácter previo a su introducción determinando las condiciones óptimas de germinación.

En este trabajo se presentan los resultados obtenidos mediante la comparación del efecto de la aplicación de un tratamiento pre-germinativo (escarificación mecánica) sobre la germinación inmediatamente posterior a su recolección en campo. Para ello se han analizado once índices de germinación: número de días necesario para iniciarse la germinación, número de días necesario para que germine el 10% de la germinación final (T_{10}), número de días necesario para que germine el 90% de la germinación final (T_{90}), número de días necesario para que germine el 50% de la germinación final (T_{50}), número de días necesario para que germine el 50% del total de las semillas (T'_{50}), período germinación (días), porcentaje de germinación total (%), velocidad germinación, velocidad germinación acumulada, coeficiente de la tasa de germinación (CRG) y energía germinativa de semillas procedentes de una población localizada en el Cerro de Orinaza (Badajoz).

García, D. & Márquez, F. 2013. **Sobre la germinación de *Ononis viscosa* L. subsp. *porrigens* Ball. *Fol. Bot. Extremadurensis* 7: 5-12.**

Palabras clave: Extremadura, Fabaceae, Germinación, *Ononis*.

Summary:

Ononis viscosa L. subsp. *porrigens* Ball, an *Ibero-Maghrebian* taxon has a very limited distribution in Extremadura, with a pair of currently known populations. In order to conserve their propagules in a genebank is necessary to monitor the viability and vigor of seeds prior to its introduction by determining the optimum conditions for germination.

This paper presents the results obtained by comparing the effect of applying a pre-germination treatment (mechanical scarification) on germination immediately after their collection in the field. This has been analyzed eleven germination indices: number of days required to start germination, number of days required for 10% of the total number of seeds to have germinated (T_{10}), number of days required for 90% of the total number of seeds to have germinated (T_{90}), number of days required for 50% of the total number of seeds to have germinated (T_{50}), number of days for 50 % of the total number of seeds germinated (T'_{50}), germination period (days), total germination (final germination percentage) (%), speed of germination, speed of accumulated germination, coefficient of the rate of germination (CRG) and germination energy of seeds from a population located in the Cerro de Orinaza (Badajoz).

García, D. & Márquez, F. 2013. **Germination trials of *Ononis viscosa* L. subsp. *porrigens* Ball. *Fol. Bot. Extremadurensis* 7: 5-12.**

Key words: Extremadura, Fabaceae, Germination trials, *Ononis*.

Introducción

Ononis viscosa L. subsp. *porrigens* Ball in *J. Linn. Soc., Bot.* 16: 406 (1878), es un endemismo de distribución ibero-magrebí (suroeste de la Península Ibérica: Badajoz, Cádiz, Huelva, Málaga y Sevilla; y noroeste de Marruecos) (Devesa, 1987, 2000, 2011; Anthos, 2013) escasamente representado en Extremadura, teniéndose testimonio de su localización en zonas calcáreas próximas al Cerro de Orinaza en la ciudad de Badajoz (29SPD70) y en El Manantío (29SPC78) (Vázquez & al., 2003; Anthos, 2013; GBIF, 2013) (Figura 1).

En Extremadura aparece localizado entre los 200-240 m.s.n.m. sobre suelos con escasa potencia de naturaleza calcárea, conviviendo con especies de pastizales terofíticos de la asociación *Thero-Brachypodietea* Br.-Bl. in Br.-Bl., Emberger & Molinier 1947 (art. 2b, 8).

Recientemente en el Cerro de Orinaza (Badajoz) se ha proyectado la realización de obras para la rehabilitación integral del Fuerte de San Cristóbal, la consolidación del Baluarte y de los elementos que integran el conjunto histórico. Entre las propuestas de trabajo se propone la eliminación de vegetación no deseada, asociada a los elementos constructivos, mediante la aplicación de herbicidas. Sin embargo, se pretende mantener la vegetación preexistente que ocupa el glacis o explanada (Figura 1).



Figura 1. Detalle de una planta de *Ononis viscosa* L. subsp. *porrigens* Ball (izquierda), obras de rehabilitación (superior derecha), glacis o explanada (inferior derecha) del Fuerte de San Cristóbal (20 de abril de 2013).

Por las limitaciones y condicionantes enumerados anteriormente se consideró necesaria la recolección de los materiales existentes de *Ononis viscosa* L. subsp. *porrigens* Ball para su posterior conservación y almacenamiento en el Banco de Germoplasma de Especies Amenazadas del Centro de Investigación La Orden-Valdesequera, evaluando con carácter previo a su inclusión su viabilidad y capacidad germinativa.

El objetivo perseguido con este trabajo es evaluar la respuesta sobre la germinación frente a un tratamiento pre-germinativo (escarificación mecánica) en semillas de *Ononis viscosa* L. subsp. *porrigens* Ball, procedentes de una población localizada en el Cerro de Orinaza, (Badajoz) mediante la comparación de once índices de germinación: número de días necesario para iniciarse la germinación, número de días necesario para que germine el 10% de la germinación final (T_{10}), número de días necesario para que germine el 90% de la germinación final (T_{90}), número de días necesario para que germine el 50% de la germinación final (T_{50}), número de días necesario para que germine el 50% del total de las semillas (T'_{50}), período germinación (días), porcentaje de germinación total (%), velocidad germinación, velocidad germinación acumulada y coeficiente de la tasa de germinación (CRG).

Material y métodos

Se ha trabajado con los materiales recolectados en una población de *Ononis viscosa* L. subsp. *porrigens* Ball localizada en el Cerro de Orinaza del municipio de Badajoz (UTM 29SPD70) (Figura 2).

La población se encuentra a una altitud media de 200 m.s.n.m. sobre terrenos llanos o con suave pendiente (<2%). El sustrato geológico está constituido por calizas con intercalaciones de niveles areniscosos y/o pizarrosos (calizas marmóreas dolomíticas y pizarras del Cámbrico Inferior) (IGME, 2003) que han originando suelos del tipo cambisol calcáreo, con un pobre contenido en materia orgánica, baja a media capacidad de retención de agua y pH básico (IUSS GRUPO DE TRABAJO WRB, 2007).

La precipitación media anual (mm) es de 479,6 mm, concentrándose entre los meses de Septiembre a Diciembre el 45% del total, y la temperatura media anual es de 16,7°C (AEMET, 2011).

Aparece distribuido en tres núcleos poblacionales en la zona oeste del cerro de Orinaza, ocupando una superficie total aproximada de 5270 m²: área oeste-noroeste (3120 m²) y sur-suroeste (1450 m²) de suelo natural y glaciés, y noroeste-norte, correspondiente a la liza del Fuerte de San Cristóbal (ss. XVII-XVIII) donde abarca una superficie aproximada de 700 m².

El hábitat se caracteriza por la presencia de pastizal terofítico donde convive con *Allium pallens* L., *Filago pyramidata* L., *Campanula erinus* L., *Convolvulus arvensis* L., *Silene micropetala* Lag., *Ajuga reptans* (L.) Schreb., *Nepeta tuberosa* L., *Salvia argentea* L., *Verbascum sinuatum* L., *Avena barbata* L., *Brachypodium distachyon* (L.) P.Beauv., *Stipa capensis* Thunb., etc.

Se recolectaron al azar frutos completos de plantas localizadas en dicha población siguiendo los criterios expuestos por el *European Native Seed Conservation Network* para la recolección de semillas de especies silvestres (ENSCONET, 2009). La recolección se realizó a principios del mes de julio del año 2012 (8/07/2012).

Se introdujeron los frutos completos en sobres de papel permeable. Posteriormente en laboratorio se procedió a la limpieza de las semillas mediante el empleo de tamices de diferente luz de malla. Finalmente las semillas se almacenaron en sobres porosos y se sometieron a un proceso de desecación progresiva a temperatura ambiente poniéndolas en contacto con gel de sílice en un desecador.

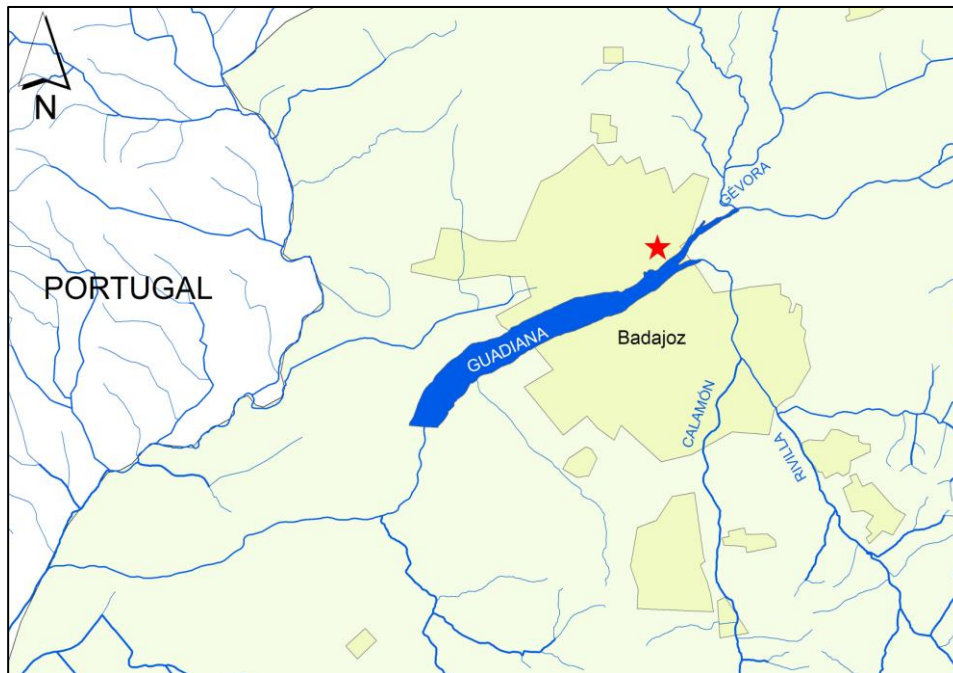


Figura 2. Localización de la población de *Ononis viscosa* L. subsp. *porrigens* Ball en ciudad de Badajoz.

Posteriormente las semillas fueron conservadas en gel de sílice a temperatura ambiente, en las dependencias de la Sección de Producción Forestal del Centro de Investigación La Orden-Valdesequera.

Los ensayos de germinación fueron realizados en una cámara de germinación (*RADIBER* Modelo *AGP-1400-HR*) con aquellas condiciones que habían proporcionado los mejores resultados en trabajos previos (oscuridad, temperatura 19°C y humedad 100%) (Rincón & al., 2008).

Se utilizaron dos lotes de 100 semillas repartidas en cuatro réplicas de 25 semillas (control/tratamiento pregerminativo). Cada una de las réplicas se situó en una placa de Petri de 9 cm de diámetro y 1,2 cm de profundidad, estéril con agar al 1%, con un espesor de 2 veces la dimensión mayor de las semillas. Las semillas se distribuyeron de forma equidistante sobre la superficie del agar. Se realizó un pretratamiento de escarificación mecánica mediante el empleo de un papel de lija de grano fino.

Los ensayos de germinación se iniciaron el día 9 de julio del año 2012. Se revisaron diariamente durante el período total establecido para el desarrollo del ensayo de germinación (21 días), considerando que una semilla había germinado cuando se producía la aparición del extremo apical de la radícula (2 mm) a través de la cubierta seminal. Las semillas germinadas fueron retiradas después de cada recuento.

Para evaluar la viabilidad de las semillas que no germinaron durante el período de duración del ensayo, éstas fueron sometidas a una prueba de viabilidad mediante el test de tetrazolio según la *Association of Official Seed Analysts* (2011) y la *International Seed Testing Association* (2007).

Se determinaron once índices de germinación cuyas fórmulas de cálculo aparecen reflejadas en la tabla 1.

Con el propósito de determinar si existían diferencias estadísticamente significativas en los parámetros germinativos calculados entre las semillas sometidas al tratamiento pregerminativo y aquellas que no lo fueron se empleó el test de la *U* de Mann-Whitney (Mann & Whitney, 1947). El análisis estadístico se realizó mediante el paquete estadístico PASW Statistics v. 18.0.0, y la representación gráfica de los resultados mediante el programa Sigmaplot v. 11.0.

ÍNDICE DE GERMINACIÓN	FÓRMULA	VARIABLES
T ₀	Número de días necesario para iniciarse la germinación	
T ₁₀	Número de días necesario para que germine el 10% de del total de las semillas germinadas	
T ₅₀	Número de días necesario para que germine el 50% del total de las semillas germinadas	
T' ₅₀	Número de días necesario para que germine el 50% del total de las semillas	
T ₉₀	Número de días necesario para que germine el 90% de del total de las semillas germinadas	
Período de germinación	Número de días comprendido entre la germinación del 10 y el 90% del total de las semillas germinadas	
Porcentaje de germinación total (%)	$\frac{N}{N_t} * 100$	N (número semillas germinadas), N _t (número total semillas del ensayo)
Energía germinativa	Porcentaje de semillas germinado durante el test de germinación hasta el momento donde la cantidad de semilla germinada por día ha llegado al máximo	
Velocidad de germinación	$(N_1 \cdot 1) + (N_2 - N_1) \cdot \frac{1}{2} + (N_3 - N_2) \cdot \frac{1}{3} + \dots + (N_n - N_{n-1}) \cdot \frac{1}{n}$	N ₁ , N ₂ , N ₃ , ..., N _n Número de semillas germinadas observadas en los días 1, 2, 3, ..., n-1 y n
Velocidad de germinación acumulada	$\left[\frac{N_1}{1} + \frac{N_2}{2} + \frac{N_3}{3} + \dots + \frac{N_n}{n} \right]$	N ₁ , N ₂ , N ₃ , ..., N _n Número acumulado de semillas germinadas en los días 1, 2, 3, ..., n-1 y n
Coefficiente de la tasa de germinación (CRG)	$\frac{[N_1 + N_2 + N_3 + \dots + N_n]}{(N_1) + (N_2 \cdot 2) + (N_3 \cdot 3) + \dots + (N_n \cdot n)} \cdot 100$	N ₁ , N ₂ , N ₃ , ..., N _n Número de semillas germinadas en los días 1, 2, 3, ..., n-1 y n

Tabla 1. Formulas empleadas para el cálculo de los índices de germinación empleados en este trabajo.

Resultados y discusión

La Tabla 2 muestra los valores promedios y el error estándar para el tratamiento (escarificación mecánica) y el control.

Variables	ESCARIFICACIÓN MECÁNICA	CONTROL
Número de días necesario para iniciarse la germinación	1±0	5±2
Número de días para que germine el 10% de la germinación final (T ₁₀)	2±0	5±2
Número de días para que germine el 50% de la germinación final (T ₅₀)	2±0	12±2
Número de días para que germine el 50% del total de las semillas (T' ₅₀)	2±0	-
Número de días para que germine el 90% de la germinación final (T ₉₀)	4±1	19±2
Período germinación (días) T ₉₀ – T ₁₀	1,75±0,50	13,50±0,58
Porcentaje de germinación total (%)	100,00±0,00	31,00±5,03
Energía germinativa	65,00±3,83	18,00±9,52
Velocidad germinación	3,65±0,15	0,10±0,02
Velocidad germinación acumulada	11,22±0,35	0,77±0,20
Coefficiente de la tasa de germinación (CRG)	40,13±2,70	8,04±0,91

Tabla 2. Número de días necesario para iniciarse la germinación, número de días necesario para que germine el 10% de la germinación final (T₁₀), número de días necesario para que germine el 90% de la germinación final (T₉₀), número de días necesario para que germine el 50% de la germinación final (T₅₀), número de días necesario para que germine el 50% del total de las semillas (T' ₅₀), porcentaje de germinación total (%), velocidad germinación, velocidad germinación acumulada, coeficiente de la tasa de germinación (CRG) y período germinación (en días) (T₉₀-T₁₀). Media ± error típico de la media. 4 réplicas, número de semillas por réplica 25. Test de germinación realizado en el mes de julio de 2012 con semillas recolectadas en campo de la población localizada en el Cerro de Orinaza (Badajoz).

En la figura 3 aparecen representadas las curvas de germinación acumulada obtenidas para ambos en los ensayos de germinación realizados (tratamiento/control).

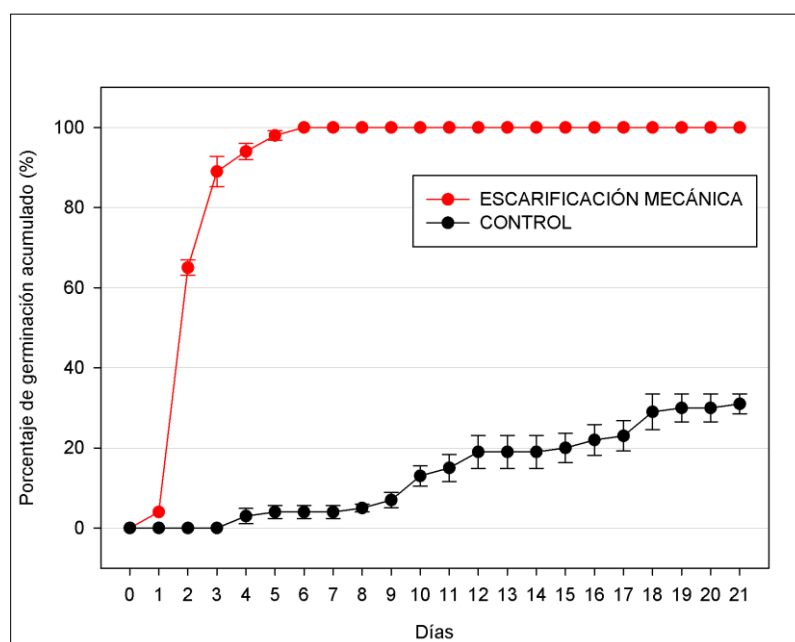


Figura 3. Curva de germinación acumulada. Tratamiento (escarificación mecánica) y control. Media ± error típico de la media. 4 réplicas, número de semillas por réplica 25.

El tratamiento de escarificación mecánica produce un incremento en el porcentaje de germinación final respecto al control cercano al 70%, garantizando la germinación del total de las semillas viables a partir del sexto día (Tabla 2, Figuras 3 y 4B).

Por otro lado, se observa una clara reducción en el número medio de días necesarios para iniciarse la germinación (4 días) y en el número de días necesario para que germine el 10 % (T₁₀) (3 días), siendo este efecto mucho más patente en el número de días necesario para que germine el 50% de la germinación

final (T_{50}) (10 días) (Tabla 2, Figura 4A). Además ya en el día 2 se alcanza un porcentaje de germinación del 50% del total de las semillas (T'_{50}) cuando son sometidas al tratamiento de escarificación mecánica (Tabla 2, Figura 4A).

El número de días necesario para que se alcance el 90% de la germinación final (T_{90}) es quince días superior en aquellas semillas no escarificadas mecánicamente, prolongándose el período de germinación ($T_{90} - T_{10}$) durante casi 14 días (Tabla 2, Figura 4A).

Si evaluamos la energía germinativa ésta es netamente superior (un 47% mayor) en las semillas sometidas a escarificación mecánica (Tabla 2, Figura 4B).

Las otras tres variables analizadas velocidad germinación, velocidad de germinación acumulada y coeficiente de la tasa de germinación se ven claramente incrementados al aplicar el tratamiento pre-germinativo (Tabla 2, Figura 4C y 4D).

En relación a la viabilidad de las semillas no germinadas su porcentaje alcanza valores del 98,50 \pm 1,50%, siendo únicamente 3 semillas dentro de una de las réplicas del control valoradas como inviables.

Los resultados del tratamiento de escarificación mecánica variaron significativamente de los valores control. El factor pre-tratamiento germinativo determinó diferencias significativas ($p < 0,05$) para los índices de germinación analizados: número días para que se produzca el inicio de la germinación ($p = 0,0132$), número de días necesario para que germine el 10% de la germinación final (T_{10}) ($p = 0,0132$), número de días necesario para que germine el 50% de la germinación final (T_{50}) ($p = 0,0132$), número de días necesario para que germine el 90% de la germinación final (T_{90}) ($p = 0,0152$), porcentaje de germinación total (%) ($p = 0,0132$), energía germinativa ($p = 0,0202$), velocidad germinación ($p = 0,0209$), velocidad germinación acumulada ($p = 0,0209$), coeficiente de la tasa de germinación (CRG) ($p = 0,0209$) y el período de germinación (días) $T_{90} - T_{10}$ ($p = 0,0165$) (Tabla 3).

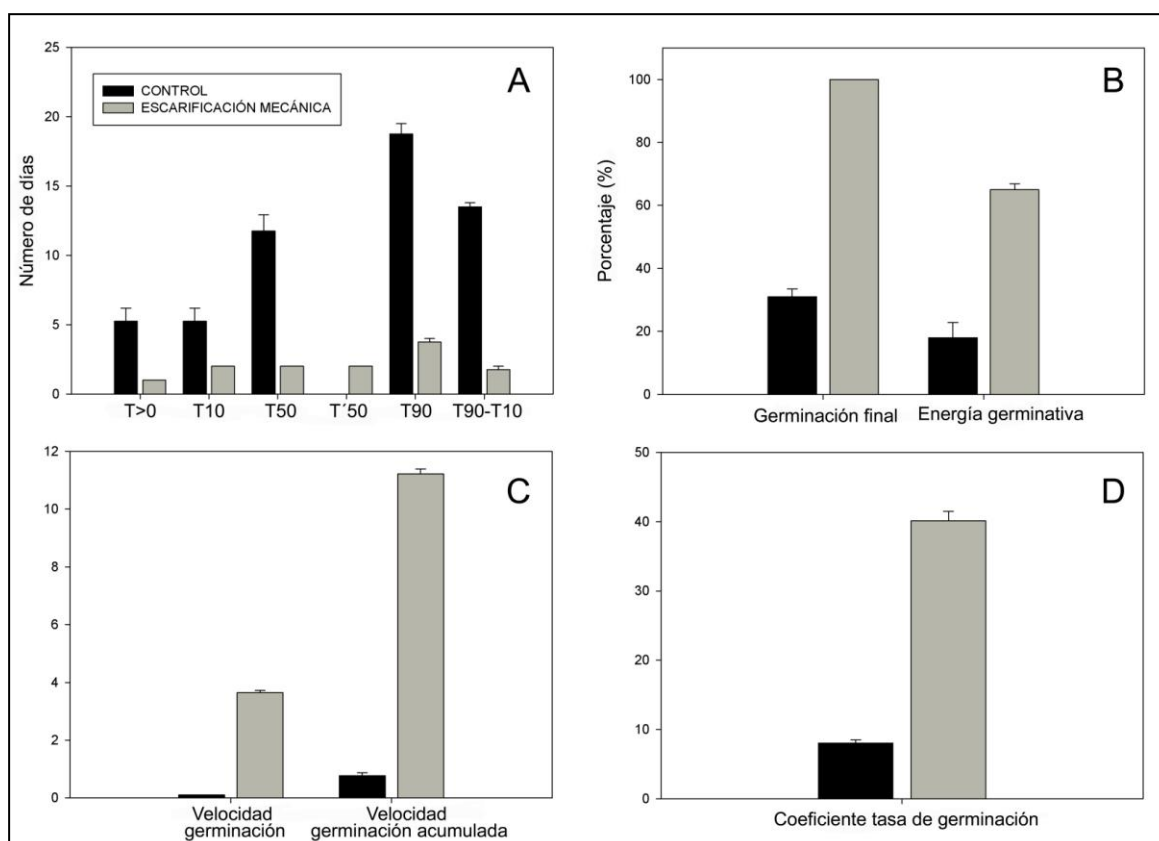


Figura 4. A) Número de días necesario para iniciarse la germinación, número de días necesario para que germine el 10% de la germinación final (T_{10}), número de días necesario para que germine el 90% de la germinación final (T_{90}), número de días necesario para que germine el 50% de la germinación final (T_{50}) y número de días necesario para que germine el 50% del total de las semillas (T'_{50}); B) porcentaje de germinación total (%) y energía germinativa; C) Velocidad de germinación y velocidad de germinación acumulada; D) Coeficiente de la tasa de germinación (CRG) y período germinación (en días) ($T_{90} - T_{10}$). Tratamiento (escarificación mecánica) y control. Media \pm error típico de la media. 4 réplicas, número de semillas por réplica 25.

VARIABLES	Z (Significación asintótica bilateral)
Número de días necesario para iniciarse la germinación	-2,477 (0,0132)*
Número de días para que germine el 10% de la germinación final (T ₁₀)	-2,477 (0,0132)*
Número de días para que germine el 50% de la germinación final (T ₅₀)	-2,477 (0,0132)*
Número de días para que germine el 90% de la germinación final (T ₉₀)	-2,428 (0,0152)*
Período germinación (días) (T ₉₀ – T ₁₀)	-2,397 (0,0165)*
Porcentaje de germinación total (%)	-2,477 (0,0132)*
Energía germinativa	-2,323 (0,0202)*
Velocidad germinación	-2,309 (0,0209)*
Velocidad germinación acumulada	-2,309 (0,0209)*
Coeficiente de la tasa de germinación (CRG)	-2,309 (0,0209)*

Tabla 3. Valor de la prueba U-Mann Withney obtenido de la comparación de pares de valores (escarificación mecánica/control) y nivel de significación entre paréntesis. n.s. no significación; *p<0,05.

Conclusiones

En este trabajo se muestran los primeros resultados obtenidos sobre la germinación de *Ononis viscosa* L. subsp. *porrigens* Ball procedentes de poblaciones naturales extremeñas.

Como conclusión se puede afirmar que el tratamiento pre-germinativo mediante escarificación mecánica (lijado) proporciona una mejora significativa en todas las variables analizadas, constituyendo un procedimiento de aplicación rápido, sencillo y seguro.

La impermeabilidad de las cubiertas seminales podría favorecer a este taxon incrementando la longevidad de la semilla, favoreciendo su permanencia en el banco de semillas del suelo y regulando su germinación en el tiempo.

Futuros trabajos deberán abordar dentro de las operaciones de rutina del banco de germoplasma el estudio de la pérdida de viabilidad germinativa de las semillas de este taxon a medio y largo plazo.

Agradecimientos

A la colaboración y ayuda de las alumnas en prácticas Silvia Medina Vicaría, María Dolores García Berjón y Blanca Martínez Sánchez durante el mes de julio de 2012. Los datos aportados en esta contribución han sido financiados por Fondos FEDER, el Programa Regional de Investigación PRI 09A059, de la Consejería de Empleo, Empresa e Innovación de la Gobierno de Extremadura, con el proyecto de investigación Actualización del catálogo de especies amenazadas de Extremadura.

Bibliografía

- AEMET. 2011. Estación meteorológica de Talavera la Real (Badajoz) (Latitud: 38°53'00"N. Longitud: 06°48'50"W. Altitud 185 m.s.n.m. Período de observación 1955-2011). Servidor de datos ftp: de la Agencia Estatal de Meteorología. Recurso electrónico disponible en: <ftp://ftpdatos.aemet.es> hasta el 29 de octubre de 2012 [01/08/2012].
- Anthos. 2013. Sistema de información de las plantas de España. Real Jardín Botánico, CSIC-Fundación Biodiversidad. Recurso electrónico en www.anthos.es. Consulta realizada en abril de 2013.
- AOSA. 2011. *Tetrazolium testing handbook. Contribution No. 29*. Handbook of Seed Testing. Actualizado a Marzo de 2011.
- Devesa, J.A. 1987. *Ononis* L. En: B. Valdés; S. Talavera & E. Fernández-Galiano (eds.) *Flora Vascular de Andalucía Occidental 2*: 132-154. Ketres Editora S.A. Barcelona.
- Devesa, J.A. 2000. *Ononis* L. En: S. Castroviejo (coord.). *Flora Ibérica* Vol. VII(II): 590-646. Real Jardín Botánico, CSIC. Madrid.
- Devesa, J.A. 2011. *Ononis* L. En: G. Blanca, B. Cabezedo, M. Cueto, C. Salazar & C. Morales Torres (eds.) *Flora Vascular de Andalucía Oriental*, págs. 184-188. Universidades de Almería, Granada, Jaén y Málaga, Granada.
- ENSCONET. 2009. European Native Seed Conservation Network. *Seed Collecting Manual for Wild Species*. Royal Botanic Gardens, Kew (UK) & Universidad Politécnica de Madrid (Spain). 36 pp.
- GBIF. 2013. Global Biodiversity Information Facility. www.gbif.net. (2013-04-09). Herbarium HSS. (9266, 9267, 10157, 10157, 33910, 50011, 50012). Centro de Investigación La Orden-Valdequiera. (accessed through GBIF data portal, <http://data.gbif.org/datasets/resource/291>, 2013-04-09).
- I.G.M.E. 2003. *Memoria del Mapa geológico de España 1:50.000 Segunda Serie (MAGNA)*. Badajoz. Hoja número 775. Instituto Geológico y Minero de España. 30 pp. Madrid.
- ISTA. 2007. Tetrazolium test. International Rules for Seed Seed Testing. *Seed Science and Technology*: 6-10.
- IUSS Grupo de Trabajo WRB. 2007. *Base Referencial Mundial del Recurso Suelo. Primera actualización 2007. Informes sobre Recursos Mundiales de Suelos No. 103*. FAO, Roma.

- Mann, H.B. & Whitney, D.R. 1947. On a Test of Whether one of Two Random Variables is Stochastically Larger than the Other. *Annals of Mathematical Statistics* 18 (1): 50–60.
- Rincón, S.; Ramos, S. & Guerra, M.J. 2008. Ensayos de germinación de especies del género *Ononis* L. (Fabaceae) amenazadas en Extremadura (España). *Folia Botanica Extremadurensis* 2: 5-9.
- Vázquez, F.M.; Ramos, S.; Lucas, A.B.; Blanco, J. & García, S. 2003. 123. Contribución al conocimiento de la flora extremeña (España). *Acta Botanica Malacitana* 28: 181-184.