

Estudi comparatiu de la germinació de dues espècies del gènere *Allium* sect. *Allium*

MARIA CRISTINA GIFRE & JOAN FONT GARCÍA

Grup de Recerca de Flora i Vegetació. Departament de Ciències Ambientals de la Universitat de Girona
Campus Montilivi s/n. E-17071 Girona

cristinagifre@gmail.com

Rebut: 9.12.2010
Acceptat: 31.12.2010

RESUM

En aquest treball s'ha estudiat la resposta germinativa de les llavors de dues espècies del gènere *Allium* (sect. *Allium*), una rara i protegida, *A. pyrenaicum*, i una altra de comuna, *A. sphaerocephalon*. S'han aplicat diferents pretractaments i un fotoperíode de 24 h de foscor per tal de simular diferents condicions de germinació. Ambdues espècies van mostrar un elevat percentatge de llavors viables, una part de les quals eren dorments. Aquest percentatge de llavors dorments podria estar causat pel moment de recol·lecció més tardà d'una de les poblacions. En les localitats on coexisteixen les espècies només es va detectar variabilitat interpoblacional en la germinació, causada per la dormició observada. La raresa d'*A. pyrenaicum* no sembla deguda als requeriments de germinació sinó a causes històriques que l'han restringit a l'interval altitudinal de distribució i als hàbitats que ocupa.

Paraules clau: germinació de llavors, *Allium*, diferències intraespecífiques i interespecífiques, viabilitat de les llavors, dormició.

Abstract

The germination of two species of *Allium* (sect. *Allium*), a rare and protected, *A. pyrenaicum*, and a common, *A. sphaerocephalon*, is studied. Different pre-treatments and a photoperiod of 24 h of darkness have been applied in order to simulate different germination conditions. Both species showed a high percentage of viable seeds, a part of which were dormant. This percentage of dormant seeds could be the caused by the more latter recollection moment of one of the populations. In species coexistence

localities only inter-population variability in germination was detected, caused by the observed dormancy. The rarity of *A. pyrenaicum* does not seem to be caused by germination requirements but for historical causes that have restricted it to the distribution altitudinal range and the habitats that occupies.

Key words: seed germination, *Allium*, intra-specific and inter-specific differences, seed viability, seed dormancy.

INTRODUCCIÓ

Les llavors són estructures fonamentals en el manteniment de la majoria de les poblacions de plantes amb flor i la seva germinació està sovint lligada a condicions ambientals específiques (VANDELOOK *et al.*, 2008). A més, és freqüent que les llavors presentin mecanismes de dormició que només es trenquen per estímuls concrets (FENNER, 1993). La dormició desapareix com a resultat de l'exposició de la llavor a un simple factor a la intensitat requerida durant un període adequat de temps (BRADBEER, 1988). La dormició és una barrera per a la utilització de moltes plantes en programes de restitució i/o revegetació (COCHRANE & PROBERT, 2006), per la qual cosa l'estudi de la germinació d'espècies amenaçades és necessària per a desenvolupar futures estratègies de conservació (FUENTES & ESTRELLES, 2005; LORITE *et al.*, 2007). Tot i ser molt adequats per a aconseguir una important quantitat d'informació, encara hi ha pocs estudis comparatius entre les característiques de plantes vasculares rares amb d'altres de comunes que alhora són filogenètica, morfològica i fenològicament properes (BEVILL & LOUDA, 1999; LAVERGNE *et al.*, 2003).

En aquest treball s'han estudiat dos tàxons del gènere *Allium* (sect. *Allium*), com són *A. pyrenaicum* Costa & Vayreda in Costa i *A. sphaerocephalon* L. subsp. *sphaerocephalon* (MATHEW, 1996; KRIMINŃSKA *et al.*, 2008). El primer és un tàxon endèmic, amb una distribució restringida al sector central i oriental dels Prepirineus meridionals (PASTOR & VALDES, 1983) on viu en zones rocoses entre (460)1.000-1.400 m d'altitud. Es tracta d'una espècie protegida a Catalunya (Generalitat de Catalunya, 2008) i a Aragó (Gobierno de Aragón, 2004) amb un programa de seguiment de les poblacions catalanes (OLIVER, 2008). L'altre tàxon està àmpliament distribuït per Europa, excepte a Escandinàvia, i es pot trobar des del nivell del mar fins als 2.200 metres. Es fa en ambients diversos com vessants pedregosos secs o rocosos, terrenys erms, camps cultivats, vores de carreteres, platges, matollars, etc, tot i que també es cultiva i comercialitza amb finalitats ornamentals, (MATHEW, 1996).

L'objectiu del nostre estudi és determinar i comparar les respostes germinatives d'aquestes dues espècies d'*Allium* per tal d'establir l'existència de diferències interespecífiques i interpoblacionals que puguin estar relacionades amb els seus diferents graus de raresa.

MATERIAL I MÈTODES

a) Material vegetal

Entre els mesos de juliol i setembre de 2007, es van recol·lectar un mínim de deu umbel·les, amb càpsules madures tancades, de les dues espècies, *A. pyrenaicum* (Apyr) i *A. sphaerocephalon* (Asph).

Les mostres procedien de quatre localitats del NE de la península Ibèrica on eren presents les dues espècies o només la més comuna, situades al llarg d'un interval altitudinal (taula 1). Els fruits es van deixar en un hivernacle durant 2-3 setmanes fins al seu complet assecat i obertura espontània (post-maduració). Les llavors obtingudes de cada localitat van ser barrejades (SPECHELT & KELLER, 1997) i mantingudes en vials de vidre amb un volum equivalent de gel de sílice (BACCHETTA *et al.*, 2008) a temperatura ambient (20°C) fins al seu ús.

b) Experiment de germinació

Per tal de simular diferents condicions de germinació es van aplicar quatre pretractaments (taula 2) i un fotoperíode de 24 h de foscor, obtingut cobrint cada placa de Petri amb dues làmines de paper d'alumini (NARBONA *et al.*, 2006). Els experiments es van realitzar utilitzant plaques de 55 x 14 mm amb un disc de paper de filtre (ALRM13054252, Filtros Anovia S.A., Catalunya) a l'interior, el qual va ser prèviament esterilitzat a 120°C durant 20 min. Cada placa contenia 25 llavors, i es van fer 4 rèpliques per pretractament i el control. En el moment de la sembra es van afegir 2 ml d'aigua desionitzada utilitzant una micropipeta i les plaques convenientment identificades van ser col·locades aleatòriament en les lleixes d'un armari germinador (PGA-180, SLAB, Catalunya). Les condicions d'incubació foren de 16°C constants (temperatura òptima) i un fotoperíode de 12 h llum/12 h foscor (SPECHELT & KELLER, 1997).

Les plaques de Petri es revisaven cada 3 dies, durant un període de 46 dies, i es recol·locaven

Localitats	Coordenades	Altitud (m)	Tàxon	N	Data (dd/mm/aa)
Santuari de Cabrera [CAB]	2°24'31,86"E	1300	Apyr	11	08/08/07
	42°4'30,57"N		Asph	15	24/08/07
Puig Llandrics [PLL]	2°22'56,63"E	1100	Apyr	15	21/09/07
	42°9'55,12"N		Asph	11	
Santa Magdalena de Terrades [STM]	2°49'44,81"E	500	Asph	10	20/07/07
	42°19'31,76"N				
Massís del Montgrí [MTG]	3°8'51,26"E	175	Asph	10	25/07/07
	42°3'35,72"N				

Taula 1. Origen de les mostres, coordenades, situació altitudinal, tàxon, nombre d'umbel·les i data de recol·lecció.

Condicions de germinació	Pretractaments
Germinació primaveral després de l'hivern (estratificació freda)	17-39 dies a una temperatura de $+4 \pm 0.6^{\circ}\text{C}$ [WINT]
Foc ràpid de baixa intensitat	$+100 \pm 5^{\circ}\text{C}$ durant 1 minut [FIRE1]
Foc lent de baixa intensitat	$+100 \pm 5^{\circ}\text{C}$ durant 5 minuts [FIRE2]
Foc ràpid i intens	$+120 \pm 5^{\circ}\text{C}$ durant 1 minut [FIRE3]

Taula 2. Condicions de germinació simulades i pretractaments aplicats.

aleatòriament a cada observació. Les llavors germinades eren comptades i retirades i, en el cas de les plaques de fosc, tot el procés es duia a terme sota llum verda. Una llavor es considerava germinada quan la coberta s'havia trencat i la radícula era visible (protrusió radicular) (SALVADOR & LLORET, 1995; ALBERT *et al.*, 2002; LORITE *et al.*, 2007). Periòdicament, s'afegia aigua addicional (0,25-0,5 ml) per tal de mantenir les condicions d'humiditat de la placa.

c) Viabilitat

En finalitzar l'experiment de germinació, es va realitzar un test amb tetrazole (utilitzant una dissolució al 5% de clorur de 2,3,5-trifenil de tetrazole) per comprovar la viabilitat de les llavors no germinades (MOORE, 1985; SPECHT & KELLER, 1997; NARBONA *et al.*, 2006).

d) Anàlisi de les dades

Les variables calculades, a partir dels experiments descrits anteriorment, foren: el percentatge de llavors viables germinades (G'), la llargària mitjana del temps d'incubació en dies (MLIT) i, només pels controls, el percentatge de llavors mortes (M), el percentatge de llavors en dormició (D) i el percentatge de llavors germinades (G) (RANAL & GARCIA DE SANTANA, 2006; KARLSSON & MILBERG,

2007). Les dades de MLIT van ser transformades calculant-ne l'arrel de l'arcsinus i les dades de G' van ser transformades aplicant-hi el logaritme neperià. Les diferències entre G' i MLIT van ser testades utilitzant una ANOVA de dos factors i els efectes dels pretractaments i la fosc van ser testats (excloent les dades d'*A. sphaerocephalon* de Puig Llandrics) amb una ANOVA d'un factor i un test post-hoc Tukey HSD (NARBONA *et al.*, 2006). Totes les anàlisis de dades van ser realitzades amb el paquet estadístic SPSS 1.5.

RESULTATS

a) Viabilitat de les llavors

Totes les poblacions estudiades presenten un elevat percentatge de llavors viables (G+D) però en tots els casos una part d'aquestes no germinen i són dorments (figura 1). Aquest percentatge és important a Puig Llandrics, tant per a *A. pyrenaicum* com per a *A. sphaerocephalon*. Les poblacions amb un major percentatge de llavors mortes (M) són Santa Magdalena de Terrades i el Montgrí.

b) Variabilitat interpoblacional i intraespecífica

La comparació del percentatge de llavors viables germinades i el temps mitjà d'incubació de les mostres de Cabrera i Puig Llandrics indicaria

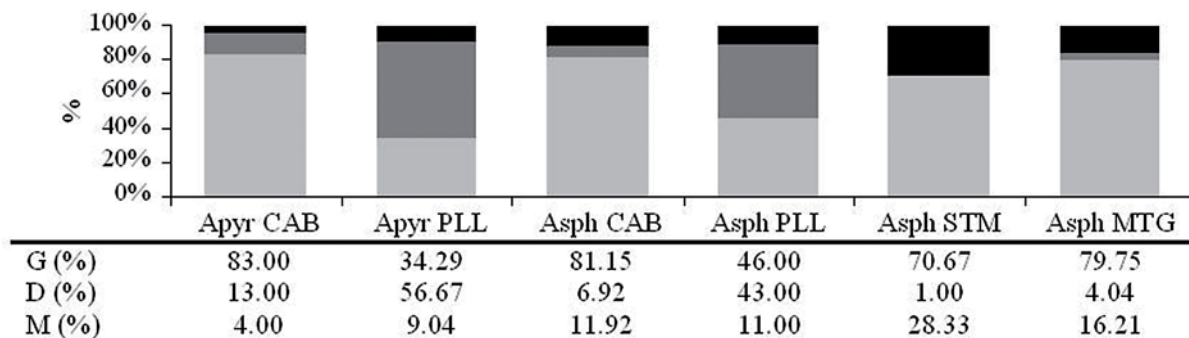


Figura 1. Percentatge de llavors germinades (G) ■, percentatge de llavors dormides (D) ■ i percentatge de llavors mortes (M) ■ de les plaques de Petri control de totes les poblacions estudiades i espècies.

que no hi ha diferències significatives entre les espècies d'*Allium* estudiades. A més, les diferències són significatives entre localitats però no estan relacionades amb les espècies (taula 3). Els percentatges de germinació a Cabrera són del 86,57% i 91,96%, i a Puig Llandrics del 37,78% i 51,77% per *A. pyrenaicum* i *A. sphaerocephalon* respectivament (taula 4). La durada mitjana del temps d'incubació a Cabrera és 15,72 i 15,35 dies, i a Puig Llandrics és 18,10 i 18,50 dies per *A. pyrenaicum* i *A. sphaerocephalon* respectivament. Per tant, les llavors de Cabrera mostren un major percentatge de

germinació que les de Puig Llandrics i requereixen un temps d'incubació menor.

c) Efecte dels pretractaments i la foscor

Per a *Allium pyrenaicum* existeixen diferències significatives entre les localitats estudiades i els pretractaments aplicats (taula 4) per G' (F=255,433, p=0,000; F=7,492, p=0,000) i per MLIT (F=31,432, p=0,000; F=10,296, p=0,000), però només en el cas de MLIT les diferències entre localitats estan causades pels pretractaments (F=3,891, p=0,006). Per la seva

	df	G' (%)			MLIT (dies)		
		MS	F	p	MS	F	p
Espècie	1	0,630	2,704	0,126	2,15E-6	0,000	0,992
Localitat	1	1,179	50,287	0,000*	0,106	5,464	0,038*
Localitat x espècie	1	0,001	0,052	0,824	0,003	0,179	0,680
Error	12	0,281			0,233		

Taula 3. Resultats de l'ANOVA comparant el percentatge de llavors viables germinades (G') i la llargària mitjana de temps d'incubació (MLIT) entre espècies i localitats. *p<0.05

Sp	Localitats	Var.	ANOVA		Tukey HSD				
			p		CONTROL	DARK	WINT	FIRE1	FIRE2
Apyr	CAB	G'	0,001	86,57±11,86	*	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
		MLIT	0,000	15,72±1,47	*	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
	PLL	G'	0,180	37,78±7,28	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
		MLIT	0,206	18,10±2,97	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
Asph	CAB	G'	0,213	91,96±8,10	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
		MLIT	0,000	15,35±2,21	*	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
	STM	G'	0,190	98,53±2,94	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
		MLIT	0,000	15,00±2,45	*	n.s.	*	n.s.	n.s.
	MTG	G'	0,685	95,17±0,30	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
		MLIT	0,000	14,13±1,47	*	n.s.	*	*	n.s.

Estan representades les mitjanes ± errors estàndards. n.s. = no significatiu. *p<0,05

Taula 4. Percentatge de llavors viables germinades (G'), llargària mitjana de temps d'incubació (MLIT) d'*A. pyrenaicum* i *A. sphaerocephalon* de les localitats estudiades i nivell de significació del test post-hoc Tukey HSD. Les dades d'Asph de Puig Llandrics han estat excloses.

banda, en el cas d'*A. sphaerocephalon* existeixen diferències significatives entre pretractaments per G' ($F=3,092$, $p=0,540$; $F=2,528$, $p=0,040$) i per MLIT ($F=2,457$, $p=0,950$; $F=23,215$, $p=0,000$) i tenen el mateix efecte en totes les localitats ($F=1,141$, $p=0,351$).

Respecte el control, cap pretractament ni la incubació en foscor ha produït un efecte negatiu en la germinació. L'efecte de la incubació en foscor ha reduït el MLIT per a *A. sphaerocephalon* de Cabrera, Santa Magdalena i Montgrí. En el cas d'*A. pyrenaicum* de Cabrera, ambdues variables han mostrat diferències significatives, un increment del percentatge de germinació i una reducció del temps d'incubació. Un altre pretractament que redueix aquest temps és el que simula un foc ràpid de baixa intensitat, i és estadísticament diferent a les mostres d'*A. sphaerocephalon* de Santa Magdalena de Terrades i del Montgrí. Finalment, apareixen diferències significatives en la simulació d'un foc lent de baixa intensitat a les mostres del Montgrí.

DISCUSSIÓ

Els resultats de viabilitat mostren que ambdós tàxons, *A. pyrenaicum* i *A. sphaerocephalon*, presenten percentatges de dormició variables en les diferents poblacions (figura 1). El percentatge més elevat de llavors dorments per a les dues espècies correspon a Puig Llandrics. La dormició permet a les llavors, generalment, romandre durant llargs períodes en el sòl, generant un banc de llavors (FENNER, 1993; BRADBEER, 1988). Així, el fet que totes les mostres, excepte Puig Llandrics, van ser recol·lectades entre els mesos de juliol i agost i van madurar en condicions de laboratori (post-maduració) suggereix la influència del moment de recol·lecció. Les umbel·les de Puig Llandrics es van recollir a finals de setembre i les llavors van madurar sobre la planta mare, pel que és possible que entressin en un estat de dormició primària (BRADBEER, 1988; FENNER, 1993; BASKIN & BASKIN, 2004). Això fa pensar que

el moment de recol·lecció podria influir en els requeriments posteriors per a induir la germinació. Caldrien doncs nous experiments amb mostres de la mateixa població recol·lectades en moments diferents, per exemple a principis (juliol-agost) i al final (setembre) de l'estiu, per tal de comprovar l'efecte de l'època de recol·lecció.

D'altra banda, el major percentatge de llavors mortes correspon a les poblacions d'*A. sphaerocephalon* de baixa altitud, és a dir de Santa Magdalena de Terrades i Montgrí, fet que sembla estar relacionat amb les dures condicions estivals durant el període de floració i fructificació.

La variabilitat interpoblacional observada en els valors de G' i MLIT a Puig Llandrics i Cabrera ha mostrat que les llavors de la primera localitat germinen en un percentatge menor i en més temps que les de Cabrera, possiblement a causa de la dormició (figura 2). Per tant, si la dormició realment va ser causada pel moment de recol·lecció i no és exclusiva d'aquesta localitat, la variabilitat interpoblacional no existiria.

La incubació en foscor accelera la germinació, possiblement perquè les condicions són més favorables per al desenvolupament de la radícula a causa d'un estímul de l'elongació (AZCÓN-BIETO & TALON, 1999). Els pretractaments de foc també modifiquen el MLIT, incrementant-lo en el cas d'un foc ràpid de baixa intensitat i reduint-lo en el cas d'un foc lent de baixa intensitat. Aquest efecte només es manifesta en llavors de les localitats de terra baixa on no és present *A. pyrenaicum* i el foc és un esdeveniment probable. Aquesta resposta estaria relacionada amb un reclutament ràpid en ambients rics en espècies germinadores.

En conclusió, les llavors d'*A. pyrenaicum* poden germinar en una àmplia diversitat de condicions, després de diferents tipus de foc, després de temperatures hivernals i en condicions de foscor. Per



Figura 2. Dades de percentatge de llavors viables germinades (G') i longitud mitjana de temps d'incubació (MLIT) d'*A. pyrenaicum* ■ i *A. sphaerocephalon* ■.

tant, la raresa d'aquesta espècie no estaria causada per requeriments restrictius de germinació sinó per les preferències d'hàbitat (VANDELOOK *et al.*, 2008) relacionades amb l'actual distribució altitudinal. Els nostres resultats confirmarien que les llavors poden ser utilitzades en programes de conservació *ex situ*, tot i que caldrà conèixer millor els factors inductors de la dormició observada.

BIBLIOGRAFIA

- ALBERT, M.; IRIONDO, J. & PÉREZ-GARCÍA, F. 2002. Effects of temperature and pretreatments on seed germination of nine semiarid species from NE Spain. *Israel Journal of Plant Sciences* 50: 103-112.
- AZCÓN-BIETO, J. & TALON, M. 1999. *Fundamentos de Fisiología Vegetal*. McGraw-Hill/Interamericana. Barcelona.
- BACCHETTA, G.; BUENO SÁNCHEZ, A.; FENU, G.; JIMÉNEZ-ALFARO, B.; MATTANA, E.; PIOTTO, B. & VIREVAIRE, M. (eds.) 2008. *Conservación ex situ de plantas silvestres*. Jardín Botánico Atlántico, Principado de Asturias/La Caixa. Gijón.
- BASKIN, J.M. & BASKIN C.C. 2004. A classification system for seed dormancy. *Seed Science Research* 14: 1-16.
- BEVILL, R.L. & LOUDAS, S.M. 1999. Comparisons of Related Rare and Common Species in the Study of Plant Rarity. *Conservation Biology* 13: 493-498.
- BRADBEER, J.W. 1988. *Seed Dormancy and Germination*. Tertiary Level Biology. Blackie. Chapman & Hall. USA (New York).
- COCHRANE, A. & PROBERT, R. 2006. Temperature and dormancy-breaking treatments: germination of endemic and geographically restricted herbaceous perennials. *Australian Journal of Botany* 54: 349-356.
- FENNER, M. 1993. *Seeds. The Ecology of Regeneration in Plant Communities*. CAB International. Wallington.
- FUENTES, N. & ESTRELLES, E. 2005. Respuesta germinativa de *Brassica remanda* (Willd.) DC. subsp. *maritima* (Willk.) Heywood., *Lavandula pedunculata* (Mill.) Cav. y *Silene cambessedesii* Boiss. & Reut. *Anales de Biología* 27: 63-68.
- Generalitat de Catalunya, 2008. DOGC núm. 5204 - 28/08/2008. Decret 172/2008, de 26 d'agost, de creació del Catàleg de flora amenaçada de Catalunya.
- Gobierno de Aragón, 2004. BOA núm. 114 - 23/09/2005. Decreto 181/2005, de 6 de septiembre, del Gobierno de Aragón, por el que se modifica parcialmente el Decreto 49/1995, de 28 de marzo, de la Diputación General de Aragón, por el que se regula el Catálogo de Especies Amenazadas de Aragón.
- KARLSSON, L. & MILBERG, G P. 2007. A comparative study of germination ecology of four *Papaver* taxa. *Annals of Botany* 99: 935-946.
- KRIMINSKA, A.; GAWLOWSKA, M.; WOLKO, B. & BOCIANOWSKI, J. 2008. Genetic diversity of ornamental *Allium* species and cultivars assessed with isozymes. *J. Appl Genet.* 49(3): 213-220.
- LAVERGNE, S.; GARNIER, E. & DEBUSSCHE, M. 2003. Do rock endemic and widespread plant species differ under the Leaf-Height-Seed plant ecology strategy scheme? *Ecol. Letters* 6: 398-404.
- LORITE J.; RUIZGIRELA, M. & CASTRO, J. 2007. Patterns of seed germination in Mediterranean mountains: study on 37 endemic or rare species from Sierra Nevada, SE Spain. *Candollea* 62(1): 5-16.
- MATHEW, B. 1996. A review of *Allium* section *Allium*. *Royal Botanic Gardens Kew*. Great Britain.
- MOORE, R.P. 1985. Handbook on tetrazolium testing. The International seed testing association. Zurich.
- NARBONA, E.; ORTIZ, P.L. & ARISTA, M. 2006. Germination variability and the effect of various pre-treatment on germination in the perennial spurge *Euphorbia nicaeensis* All. *Flora* 201: 633-641.
- OLIVER, X. 2008. Programa de seguiment i conservació de flora amenaçada. Delegació de la Garrotxa de la Institució Catalana d'Història Natural. <http://ichngarrotxa.iec.cat/ichngarrotxa/index.php>.
- PASTOR, J. & VALDÉS, B. 1983. Revisión del Género *Allium* (Liliaceae) en la Península Ibérica e Islas Baleares. *Anales de la Universidad Hispalense. Publicaciones de la Universidad de Sevilla*. Sevilla.
- RANAL, M.A. & GARCÍA DE SANTANA, D. 2006. How to measure the germination process? *Revista Brasileira de Botânica* 29: 1-11.
- SALVADOR, R. & LLORET F. 1995. Germinación en el laboratorio de varias especies arbustivas mediterráneas: efecto de la temperatura. *Orsis* 10: 25-34.
- SPECHT, C.E. & KELLER, E.R.J. 1997. Temperature requirements for seed germination in species of the genus *Allium* L. *Genetic Resources and Crop Evolution* 44: 509-517.
- VANDELOOK, F.; VAN DE MOER, D. & VAN ASSCHE, J.A. 2008. Environmental signals for seed germination reflect habitat adaptations in four temperate *Caryophyllaceae*. *Functional Ecology* 22: 470-478.