

ENSAYOS DE GERMINACIÓN EN DOS ESPECIES ENDÉMICAS AMENAZADAS DE GRAN CANARIA



Jardín Botánico Canario "Viera y Clavijo"- Unidad Asociada CSIC
(Cabildo de Gran Canaria)

Camino al Palmeral, 15, 35017 Las Palmas de Gran Canaria, España.
ncabrerag@grancanaria.com; magonzalezp@grancanaria.com

Nereida Cabrera García
Miguel Ángel González Pérez

INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS

Los Jardines Botánicos son esenciales para la conservación ex-situ de la biodiversidad genética. Estas instituciones son especialmente relevantes en el caso de especies amenazadas. Sin embargo, es fundamental que los protocolos de germinación de las especies estén establecidos (pretratamiento, dormancia de las semillas) y que las condiciones de almacenamiento (humedad y temperatura) sean las ideales para garantizar la viabilidad de las semillas durante todo el tiempo que estén depositadas en el banco. Este trabajo muestra las pruebas de germinación realizadas en dos especies endémicas amenazadas de las Islas Canarias y la utilización del test de viabilidad de resazurin para verificar su capacidad germinativa.

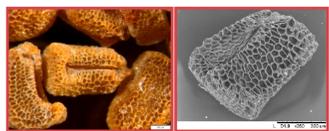
***Isoplexis isabelliana* (Webb & Berthel.) Masf.** es una especie endémica de la Isla de Gran Canaria. Está catalogado como "en peligro de extinción" por la Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza y los Recursos Naturales (Salas-Pascual *et al.*, 2011).



Existen tres localizaciones naturales: Tamadaba (75 individuos), San Mateo (232 individuos) y Valleseco (156 individuos).

Isoplexis isabelliana florece de junio a septiembre y fructifica entre septiembre y octubre. Los frutos de esta especie son cápsulas marrones, que albergan una multitud de semillas.

Las semillas presentan una ornamentación primaria e irregular reticulada en su superficie con campos abiertos y una sola pared delgada. El color de las semillas es amarillo huevo.



***Solanum lidii* Sunding** es una especie en peligro de extinción de la isla de Gran Canaria, cuya distribución se limita a seis poblaciones (93 individuos) en la parte sureste de la isla entre 350 - 725 msnm (Bañares *et al.*, 2004).



El Banco de Semillas del JBCVC dispone de dieciséis accesiones de esta especie, que han sido recogidas en diferentes años, en tres de las seis localidades en las que se ha descrito.

Solanum lidii es una especie que florece desde marzo a octubre y fructifica de mayo a noviembre originando una baya, globosa, amarillo-verdosa a anaranjada en la madurez (Bañares *et al.* 2004). Las semillas presentan una forma plana lenticular de unos 3,2 x 4,1 mm, con el embrión dispuesto lateralmente en espiral.



MATERIAL Y MÉTODOS

Se seleccionaron cuatro accesiones con diferente historial de almacenamiento del Banco de Semillas JBCVC; una accesión de la población natural de Tenteniguada, que ha sido almacenada durante 31,5 años siguiendo el protocolo del Banco de Semillas JBCVC (529/B); una accesión perteneciente a la población reintroducida de Llano de la Pez y almacenada durante 22,3 años a -10 °C en el Banco de Semillas (1236/B); una muestra de accesión en el Parque Natural de Tamadaba en septiembre de 2002 (2204/B) y almacenada a temperatura ambiente (15,8 - 22,1°C) y humedad ambiental (80,5%) y una reciente adhesión, de la población natural de Cazadores (5183/B), que ha sido almacenada a temperatura ambiente y humedad durante cuatro meses.

Test de viabilidad

Se llevó a cabo en semillas de las cuatro accesiones analizadas. Se colocaron semillas individuales en una placa de PCR de 96 pocillos que contenía 150 µL de reactivo de resazurin en cada pocillo. La placa se incubó a 35 °C durante 4 horas. El color visual y la absorbancia fueron evaluados en 570nm con un espectrofotómetro (Thermo Scientific™ NanoDrop 2000).



Germinación

Se realizó una prueba de germinación con cuatro réplicas de 25 semillas por accesión y fueron pretratadas con peróxido de hidrógeno y sembradas en agar al 1% en placas de Petri. Las semillas se incubaron a 17 °C bajo un fotoperíodo de 16 horas de luz y 8 horas de oscuridad.



El porcentaje final de germinación se registró después de 30 días. El porcentaje de germinación (%G), el tiempo medio de germinación (MGT), el tiempo hasta el 50% de la germinación final (T₅₀), la velocidad de germinación (GS) y el coeficiente de velocidad de germinación (CV), se calculó según Coolbear *et al.*, 1984 y Gavassi *et al.*, 2014.

Para el análisis de viabilidad en *Solanum lidii* se recurrió a material almacenado en el Jardín Botánico Canario "Viera y Clavijo", procedente de diferentes localidades de poblaciones naturales (Temisas, Barranco Hondo y Fortaleza de Ansite) que habían sido recolectadas en campañas de muestreos desarrolladas entre 1999 y 2003.

Este material se almacenó durante 20 años a temperatura ambiente en tubos con gel de sílice, lo que mantuvo su humedad relativa entre un 10 y un 30%. Así mismo estos ensayos se llevaron a cabo en semillas de una accesión (184/B) almacenada en el Banco de Germoplasma del Jardín Botánico Canario "Viera y Clavijo" durante 36 años para determinar la idoneidad de las condiciones de almacenamiento del Banco de Semillas (5-10% HR, -10°C).

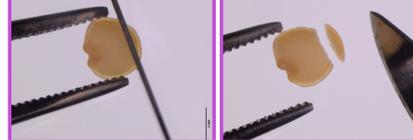
Test de viabilidad

El test de Resazurin (Min and Kang 2011, Mohammed *et al* 2019) se realizó al material que había permanecido almacenado durante 20 años a temperatura ambiente. Una docena de semillas de cada accesión fueron analizadas. La placa de PCR fue incubada a 35°C durante 4 horas, y el color visual y la absorbancia a 570 nm fueron medidos con un espectrofotómetro (Thermo Scientific™ NanoDrop 2000).



Germinación

Las semillas fueron sometidas a un pretratamiento en hipoclorito sódico y se mantuvieron en agua durante 48 horas. Cuatro réplicas de 25 semillas cada una fueron germinadas en agar (1%). Las réplicas fueron incubadas a 17°C bajo fotoperíodo de 16 h luz/ 8 h oscuridad.



En todas las accesiones seleccionadas se realizó una escarificación mecánica profunda y un tratamiento con GA3 (350ppm).

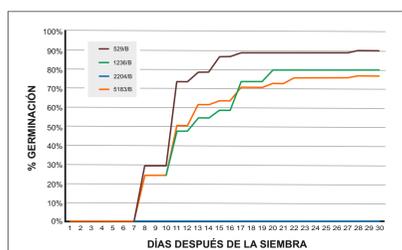
El porcentaje de germinación final fue registrado después de un periodo de incubación de 4 semanas.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN



La germinación comenzó en todas las accesiones, excepto la 2204/B, en el octavo día de la imbibición a través de la ruptura de la capa de la semilla y la protrusión de la raíz primaria.

La germinación varió de 0% (2204/B) a 89% (529/B) después de 30 días. Además, la accesión 529/B (la accesión más antigua analizada) mostró el menor tiempo medio de germinación (10,82 días) y el menor valor de T₅₀ (10,35 días), así como la mayor velocidad de germinación (GS) de las tres accesiones de *I. isabelliana* ensayadas.



Sin embargo, el análisis de ANOVA y la prueba de rango múltiple no mostraron diferencias significativas entre estas accesiones germinadas.

Cinco días después de la germinación de la semilla, las plántulas se cultivaron en un sustrato con musgo de turba, vermiculita y coco (5:1:1). Después de diez meses en el invernadero, el porcentaje de plántulas viables varió de 37,97% (1236/B) a 59,21% (5183/B)

La prueba del reactivo de resazurin no mostró diferencias del color o de la absorbancia (570nm) entre las accesiones analizadas. La absorbancia media registrada después de 4 horas a 35 °C fue de 0,640 (529/B), 0,557 (1236/B), 0,547 (2204/B) y 0,609 (5183/B).

Después de diez meses en el invernadero, el porcentaje de plántulas viables varió de 37,97% (1236/B) a 59,21% (5183/B).

La germinación comenzó el quinto día en la accesión 184/B, mientras que la accesión N36 con escarificación mecánica la ruptura de la cubierta de la semilla y la emersión de la radícula se produjo un día después, y en la accesión N65 se retrasó hasta el séptimo día. Las primeras señales de germinación de la accesión N36*, sin escarificación mecánica, así como de la accesión N34 no se produjeron hasta el día 12. El tiempo medio de germinación (MGT) varió de 9,18 (184/B) a 15,14 (N36*), mientras que la velocidad de germinación (GS) osciló entre 0,28 (N34) a 11,11 (184/B). Por otro lado, el T₅₀ varió entre 6,029 (184/B) y 12.500 (N34 y N36).

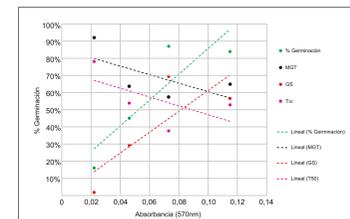
El porcentaje de germinación varió entre el 16% (N34) y el 87% (184/B) después de 30 días. La accesión 184/B que se encontraba almacenada casi 36 años en el Banco de Semillas a -10°C obtuvo los mejores porcentajes de germinación (87%). Los peores datos de germinación se obtuvieron en la accesión N34 (16%), a excepción del tiempo medio de germinación, donde la accesión N36* (sin escarificar) obtuvo el valor de MGT mayor (15,14).

El test de resazurin mostró variación en la coloración y absorbancia a 570nm después de cuatro horas a 35°C en las diferentes accesiones, variando la absorbancia medida en las accesiones desde 0,022 (N34) a 0,115 (N36). El porcentaje de germinación ($r = 0.884, p < 0.05$) y la velocidad de germinación ($r = 0.808, p < 0.05$) mostraron una correlación positiva y significativa con la absorbancia a 570nm resultante del análisis del test de resazurin. Mientras que el tiempo medio de germinación ($r = -0.642, p < 0.001$) y T₅₀ ($r = -0.608, p < 0.001$) revelaron una correlación negativa con la absorbancia obtenida a 570nm en el test de resazurin.

Porcentaje de germinación (%G), tiempo medio de germinación (MGT), velocidad de germinación (GS) y T₅₀ de las accesiones de *Solanum lidii* ensayadas.

Nº Accesión	Absorbancia 570 nm	%G	MGT (días)	GS	T ₅₀ (días)
N36	0,115	85%	10,41	9,05	8,458
N36*	0,115	14%	15,14	1,00	12,500
N65	0,046	52%	10,20	4,69	8,625
N34	0,022	16%	14,75	0,28	12,500
184/B	0,073	87%	9,18	11,11	6,029

* sin escarificación mecánica



CONCLUSIONES

Concluimos que las condiciones de muestreo y almacenamiento siguiendo el protocolo del Banco de Semillas del JBCVC mostraron un alto potencial para producir plántulas a partir de semillas almacenadas durante largos periodos, lo cual es esencial para crear una colección ex-situ que contribuye a la conservación de la especie.

En este sentido, nuestro Banco de Semillas cuenta actualmente con más de treinta accesiones de *Isoplexis isabelliana* disponibles de todas las poblaciones naturales descritas para esta especie endémica en peligro de extinción. Cinco de estas accesiones son semillas muestreadas en las localidades afectadas por el último incendio forestal que afectó al Parque Natural de Tamadaba y Valleseco en 2019.



La accesión 184/B que ha estado depositada en el Banco de Germoplasma desde 1984, lo que suponen 36 años, y cuya última prueba de germinación realizada en 1997 dio un 56% germinación, ha mejorado considerablemente el éxito germinativo (87%). El nuevo protocolo de germinación de *Solanum lidii* ha conseguido aumentar el éxito germinativo un 31% incluso después de 23 años de almacenamiento.

Estos análisis han demostrado la fiabilidad del test de viabilidad de resazurin en esta especie endémica canaria, mostrando una alta correlación ($r=0.884, p < 0.05$) con el porcentaje de germinación. Esta es la primera evidencia de la efectividad de la prueba de resazurin en una especie endémica de la región Macaronésica. Los resultados obtenidos animan a ensayar este test en otros endemismos Macaronésicos como una herramienta efectiva para el monitoreo de las colecciones de semillas de los Bancos de Germoplasma.



REFERENCIAS

- Bañares, Á., Blanca, G., Güemes, J., Moreno, J.C. and Ortiz, S., eds. (2004). Atlas y Libro Rojo de la Flora Vasculare Amenazada de España. Dirección General de Conservación de la Naturaleza. Madrid.
- Coolbear, P., Francis, A. and Grierson, D. (1984). The effect of low temperature pre-sowing treatment on the germination performance and membrane integrity of artificially aged tomato seeds. Journal of Experimental Botany, 35, 1609-1617.
- Gavassi, M.A., Fernandes, G.C., Monteiro, C.C., Peres, L.E.P. and Carvalho, R.F. (2014). Seed germination in tomato: A focus on interaction between phytochromes and gibberellins or abscisic acid. American Journal of Plant Sciences, 5, 2163-2169.
- González Pérez, M. A., Cabrera García, N. (2021). Ensayo de Germinación e Implementación del Test de Resazurin como prueba de viabilidad en el endemismo amenazado de Gran Canaria *Solanum lidii* (Solanaceae). Botánica Macaronésica 31: 55 – 66.
- González Pérez, M. A., Cabrera García, N. & Cayon Fernández, I. (2021). High seed viability recorded in an endangered species, *Isoplexis isabelliana* (Scrophulariaceae), after more than 30 years of storage in a conservation seed bank. Mediterranean Botany 42: 1-7.
- Min, T.G. and Kang, W.S. (2011). A Simple, Quick and Nondestructive Method for Brassicaceae Seed Viability Measurement with Single Seed Base Using Resazurin. Horticulture Environment and Biotechnology, 52 (3): 240-245.
- Mohammed, S., Bhattacharya, S. and Mummenhoff, K. (2019). Dead or Alive: Simple, Nondestructive, and Predictive Monitoring of Seedbanks. Trends in plant science, 24 (8): 783-784.
- Salas-Pascual, M., Quintana Vega, G. & Hernández Negrín, E. (2011). *Isoplexis isabelliana*. The IUCN Red List of Threatened Species 2011.