

## ENSAYO DE GERMINACIÓN E IMPLEMENTACIÓN DEL TEST DE RESAZURIN COMO PRUEBA DE VIABILIDAD EN EL ENDEMISMO AMENAZADO DE GRAN CANARIA *SOLANUM LIDII* (SOLANACEAE)

MIGUEL ÁNGEL GONZÁLEZ PÉREZ & NEREIDA CABRERA GARCÍA

Jardín Botánico Canario "Viera y Clavijo" - Unidad Asociada al CSIC, Camino del Palmeral nº 15, 35017, Las Palmas de Gran Canaria, Islas Canarias, e-mail: magonzalezp@grancanaria.com

Recibido: Junio 2020

**Palabras clave:** *Solanum lidii*, endemismo, especie amenazada, Islas Canarias, test resazurin, germinación.

**Keywords:** *Solanum lidii*, endemism, endangered species, Canary Islands, resazurin test, germination test.

### RESUMEN

Los bancos de semillas son esenciales para la conservación *ex situ* de la biodiversidad genética. Estas instituciones son especialmente relevantes en el caso de las especies amenazadas. Sin embargo, es esencial que se establezcan protocolos de germinación de las especies y que las condiciones de almacenamiento sean las ideales para garantizar la viabilidad de las semillas. *Solanum lidii* Sinding, es una especie endémica de la Isla de Gran Canaria en peligro de extinción que había mostrado unos discretos porcentajes de germinación (0-56%). La escarificación mecánica profunda y la exposición a GA<sub>3</sub> exógena, indujeron la germinación de las semillas hasta un porcentaje de un 85%. Los valores de absorbancia a 570nm resultantes del test de resazurin en estas muestras mostraron una alta y significativa correlación con el porcentaje de germinación ( $r = 0.884$ ,  $p < 0.05$ ). La efectividad de este test de viabilidad rápido, simple, no destructivo y predictivo en especies amenazadas es relevante para la gestión y conservación en Bancos de Germoplasma. El considerable porcentaje de germinación de accesiones de esta especie almacenadas en el Banco de Germoplasma durante casi 36 años muestra la efectividad del protocolo y las condiciones de almacenamiento de las semillas en el Banco de Germoplasma del Jardín Botánico Canario "Viera y Clavijo".

### SUMMARY

Seed banks are essential for *ex-situ* conservation of genetic biodiversity. These institutions are especially relevant for threatened species. However, it is essential that germination protocols of the species are established and that the storage conditions been the ideal ones to guarantee the viability of the seeds. *Solanum lidii* an endangered endemic species from the Gran Canaria Island that had showed inconspicuous germination percentage. Mechanic scarification and exposure to exogenous GA<sub>3</sub> induced germination of the 85% treated seeds. Absorbance values at 570 nm from the resazurin test and germination percentage showed a high correlation ( $r = 0.884$ ,  $p < 0.05$ ). The effectivity of this viability fast, simple, nondestructive and predictive test in endangered species is relevant in the management and conservation in Seed Banks. The considerable germination percentage of accessions stored in the Germplasm Bank for almost 36 years demonstrate the effectiveness of the protocol and the storage conditions of the seeds in the Germplasm Bank of the Jardín Botánico Canario "Viera y Clavijo".

## INTRODUCCIÓN

Los bancos de semillas son esenciales para la conservación *ex situ* de la biodiversidad genética de los ecosistemas naturales. La preservación de semillas es especialmente relevante para especies amenazadas, ya que las semillas son la herramienta principal para reintroducir especies de plantas (BROADHURST *et al.* 2008). El mantenimiento de la viabilidad de semillas *ex situ* durante largos períodos de tiempo en bancos de genes es un elemento clave en la conservación de los recursos fitogenéticos (FUN *et al.* 2015). Por lo tanto, debemos asegurarnos de que las muestras depositadas en los bancos de semillas puedan germinar en el momento en que sea necesario usarlas (planes de recuperación, reforestación, etc.). En este sentido, es esencial que se establezcan los protocolos de germinación de las especies y que las condiciones de almacenamiento (envasado, humedad y temperatura) sean las ideales para garantizar la viabilidad de las semillas. La germinación es una etapa muy decisiva en el ciclo de vida de las plantas, y su estudio es fundamental para la conservación de las especies (MELO *et al.*, 2004). Los estudios de germinación son importantes para la restauración de las poblaciones de plantas de especies amenazadas y en los últimos años se ha creado un número creciente de bancos de germoplasma con el objetivo de apoyar la recuperación futura de especies que podrían extinguirse en un futuro cercano (MYERS *et al.*, 2000).

También resultan fundamentales los estudios de viabilidad de las semillas. En este sentido existen multitud de ensayos de viabilidad, como la prueba de tetrazolio, ensayo de la catalasa, análisis radiográfico, etc. (BACCHETTA *et al.* 2008) aunque ninguno resulta totalmente efectivo, ya que muchos son destructivos, requieren bastante tiempo y recursos. Sin embargo, recientemente se ha desarrollado un test de viabilidad no destructivo, sencillo y predictivo que detecta daños en las membranas celulares de las semillas gracias a la combinación de un indicador de pH (resazurin) y una levadura (*Saccharomyces cerevisiae*) (MIN & KANG, 2011). De forma que los solutos expuestos al medio debido al daño de las membranas de las semillas activan la respiración de la levadura, produciendo una reacción redox, lo que es revelado por el resazurin que se traduce en un cambio de color y una disminución de la absorbancia a 570 nm. Este test ha mostrado resultados positivos en especies de diferentes familias: Apiaceae, Asteraceae, Chenopodiaceae, Cucurbitaceae, Fabaceae, Lamiaceae, Plantaginaceae, Poaceae, Rosaceae, Rubiaceae (MOHAMMED *et al.*, 2019), pero hasta la actualidad no se ha ensayado en especies de la región Macaronésica.

*Solanum lidii* Sunding (Solanaceae) es una especie en peligro de extinción de la isla de Gran Canaria (islas Canarias, España), cuya distribución se limita a cinco poblaciones (93 individuos) en la parte sureste de la isla entre 350 - 725 m s.n.m. (BAÑARES *et al.* 2004). La principal amenaza de esta especie es la presión antropogénica debido a la construcción, el pastoreo (cabras y ovejas), así como los deslizamientos de tierra, ya que sus hábitats son áreas rocosas en acantilados interiores y picos de montañas. Además, hay que añadir la escasa renovación de plántulas que se ha observado en las poblaciones naturales (BAÑARES *et al.*, 2004). Debido a esto, *S. lidii* está catalogado como "en peligro crítico" por la Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza y los Recursos Naturales (RODRÍGUEZ DELGADO *et al.*, 2011). Hoy en día, el Banco de Semillas del JBCVC

dispone de dieciséis accesiones de esta especie endémica en peligro de extinción, que han sido recogidas en diferentes años, en tres de las seis localidades en las que se ha descrito. La mayoría de las pruebas de germinación realizadas hasta la actualidad han tenido un porcentaje de éxito moderado (0-56%) probando diferentes pretratamientos (Tabla 1). Los ensayos realizados con mayor éxito se llevaron a cabo a temperaturas de 17°C (56%) y 20/18°C (50%).

Los objetivos de este estudio son: i) establecer un protocolo de germinación para *Solanum lidii* que incremente el porcentaje de germinación obtenido hasta la actualidad, ii) testar la prueba de viabilidad de reactivo resazurin en *Solanum lidii*, iii) evaluar la efectividad del protocolo y las condiciones de almacenamiento del Banco de Germoplasma del Jardín Botánico Canario Viera y Clavijo.

**Tabla 1.** Protocolos de germinación ensayados anteriormente en *Solanum lidii* en el Banco de Germoplasma del Jardín Botánico Canario Viera y Clavijo y porcentaje de germinación obtenidos. EM: Escarificación mecánica. Prueba tipo: luz/oscuridad (16/8), 1% agar.

Nº Banco	Temperatura	Luz/Oscuridad (horas)	Tratamiento	% Germinación
184/B	17 °C	16/8	Prueba tipo	8%
184/B	17 °C	16/8	3ml GA <sub>3</sub> (25ppm)	56%
184/B	17 °C	16/8	3ml KNO <sub>3</sub>	0%
184/B	24/19 °C	18/6	Prueba tipo	0%
184/B	24/19 °C	18/6	EM	0%
3042/B	20 °C	18/6	lavado con lejía 1%	0%
610/B	24/19 °C	18/6	lavado con lejía 1% 20 min, EM	0%
1993/B	25/21 °C	18/6	Prueba tipo	0%
610/B	19 °C	16/8	Prueba tipo	0%
4757/B	20/18 °C	16/8	Prueba tipo	50%
610/B	19 °C	Oscuridad	Prueba tipo	0%

## MATERIAL Y MÉTODO

### Colección de material y procedimiento inicial

*Solanum lidii* es una planta leñosa, de hasta 70 cm, espinosa con ramas erectas y robustas, que presenta hojas alternas pecioladas, oblongo-lanceoladas, densamente tomentosas de pelos estrellados; margen entero u ondulado y nervios pinnados (SUNDING, 1996; BAÑARES *et al.*, 2004). Es una especie andromonoica y autocompatible (ANDERSON *et al.*, 2006; PROHENS *et al.*, 2007), con flores de corola zigomórfica y heterándricas (ANDERSON *et al.*, 2006), en cimas laterales, de cáliz tomentoso-estrellado que florece desde marzo a octubre y fructifica de mayo a noviembre originando una baya, globosa, de amarillo-verdosa a anaranjada en la madurez (RODRIGUEZ-DELGADO *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 (Figura 1).

Para optimizar el protocolo de germinación en esta especie, así como para comprobar la efectividad del test de resazurin (MIN & KANG, 2011; MOHAMMED *et al.*, 2019) en el análisis de viabilidad en *Solanum lidii* se recurrió a material

almacenado en el Jardín Botánico Canario “Viera y Clavijo”, procedentes 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, que constaba de 86 viales (tubos y frascos) conteniendo 14.341 semillas, se almacenó durante 20 años a temperatura ambiente en tubos con gel de sílice, lo que mantuvo su humedad relativa, medida mediante actividad del agua ( $A_w$ ), entre un 10 y un 30%. Así mismo estos ensayos se llevaron a cabo en semillas de una accesión (184/B) que ha estado depositada 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,  $-10^{\circ}\text{C}$ ), y compararlas con las semillas almacenadas a temperatura ambiente.

En todas las accesiones seleccionadas se realizó una escarificación mecánica profunda (Figura 1) y un tratamiento con  $\text{GA}_3$  (350ppm). Una réplica (N36\*) de una de las accesiones se utilizó como control y en la misma no se llevó a cabo escarificación mecánica.

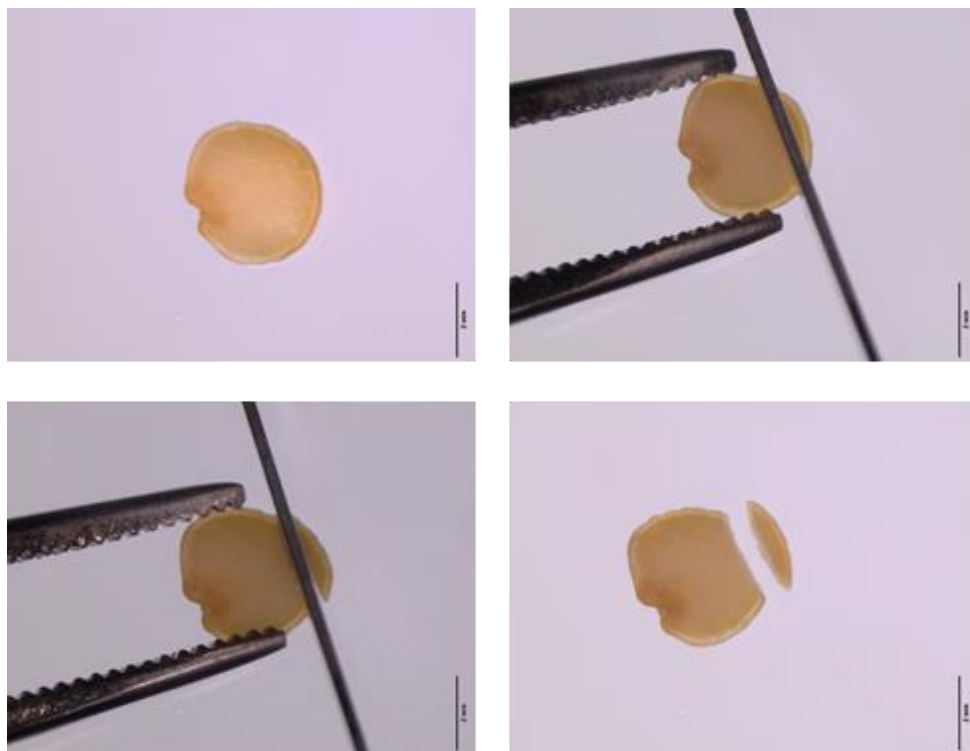


Figura 1. Proceso de escarificación profunda en semilla de *Solanum lidii*.

### Test de viabilidad

El test de resazurin (MIN & KANG 2011, MOHAMMED *et al* 2019) fue llevado a cabo en todo el material que había permanecido almacenado durante 20 años a temperatura ambiente, así como en la accesión depositada en el Banco de Semillas durante 36 años (184/B). Una docena de semillas de cada accesión

fueron analizadas, depositando cada una de las semillas en un pocillo de una placa de PCR de 96 pocillos conteniendo 150  $\mu$ L del agente resazurin (Figura 2). 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). La absorbancia varió entre 0,021 hasta 0,171. En base a la medida de absorbancia a 570nm se seleccionaron tres viales de muestras (N36, N34 y N65) con diferentes valores de absorbancia para llevar a cabo pruebas de germinación y estimar la posible correlación existente entre ambas pruebas de viabilidad.

### **Germinación**

Las semillas fueron sometidas a un pretratamiento de 10 minutos en hipoclorito sódico y posterior lavado en agua destilada y esterilizada durante 3 minutos. Posteriormente las semillas se mantuvieron en agua destilada y autoclavada durante 48 horas. Cuatro réplicas de 25 semillas cada una fueron incubadas en agar (1%) en placas de Petri de cristal de 7cm de diámetro, y suplementadas con 2 ml de GA<sub>3</sub> (350ppm), que fue reemplazado regularmente. Las réplicas fueron sometidas a fotoperiodos de 16 h luz/ 8 h oscuridad a 17°C (SANYO MLR-352). Las semillas en las que había emergido la radícula fueron contadas diariamente, removidas de las placas de Petri y repicadas en el invernadero. Se consideraba que la semilla había germinado cuando la radícula tenía un tamaño de 1-2 mm. El porcentaje de germinación final fue registrado después de un periodo de incubación de 4 semanas.

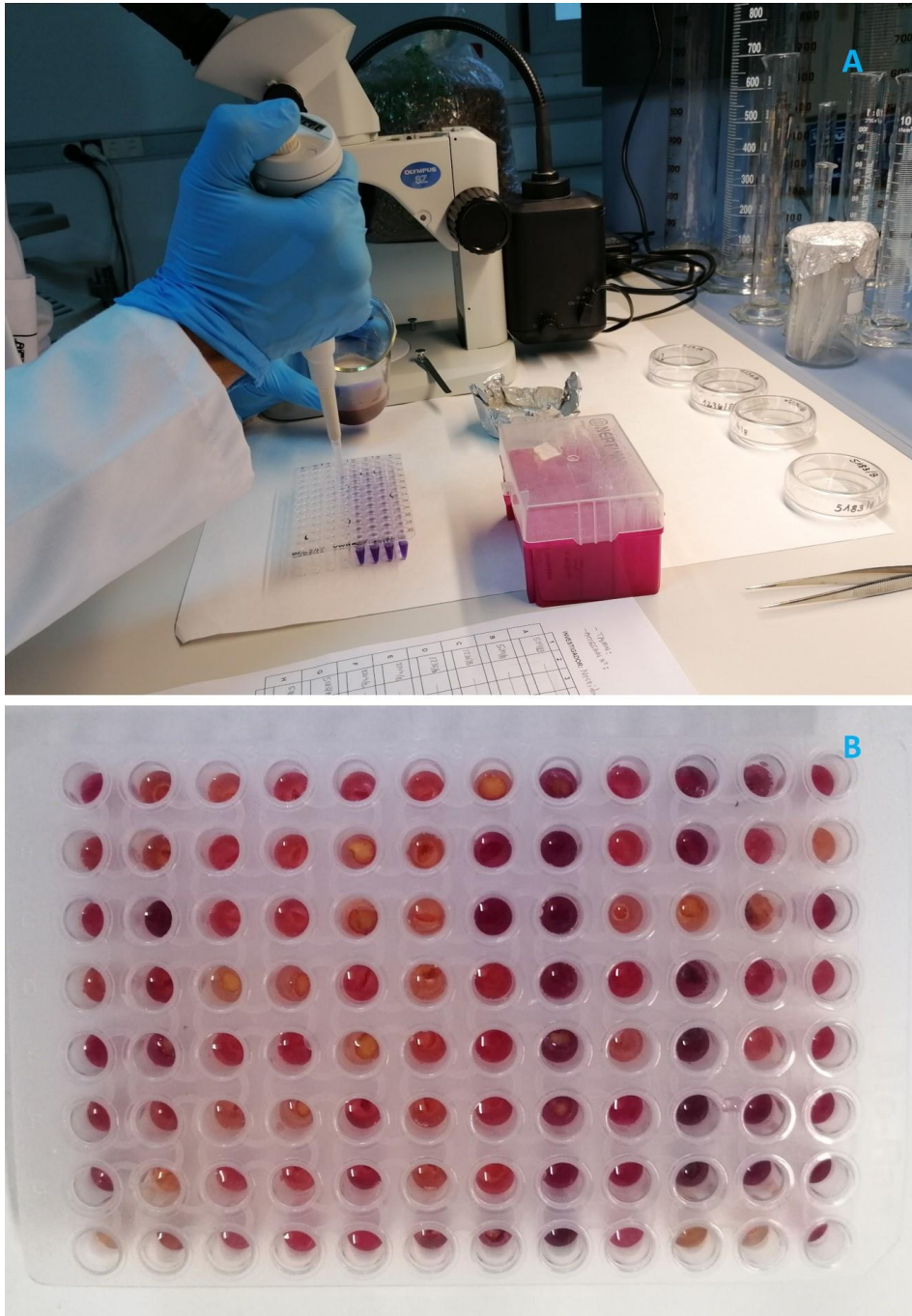
### **Análisis de datos**

Se calculó el porcentaje de germinación (%G), el tiempo medio de germinación (MGT), el tiempo del 50% de germinación final (T<sub>50</sub>) y la velocidad de germinación (GS), siguiendo a COOLBEAR *et al.*, 1984; GAVASSI *et al.*, 2014. Un análisis de ANOVA fue realizado para determinar si existían diferencias significativas entre los tratamientos con y sin escarificación mecánica. Todos estos cálculos fueron estimados mediante Excel (MICROSOFT OFFICE STANDARD 2016).

Un test de correlación de Pearson y el correspondiente test de significación entre la absorbancia a 570nm del test de resazurin, el porcentaje de germinación y otros índices (GS, MGT y T<sub>50</sub>) fue llevado a cabo en las muestras seleccionadas para germinación utilizando el programa XLSTAT (2008.3.02).

## **RESULTADOS**

La germinación comenzó el quinto día en la accesión 184/B, mientras que la accesión N36 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 (Figura 3 y 4). El tiempo medio de germinación (MGT) varió de 9,18 (184/B) a 15,14 días (N36\*), mientras que la velocidad de germinación (GS) osciló entre 0,28 (N34) a 11,11 semillas/días (184/B). Por otro lado, el T<sub>50</sub> varió entre 6,029 (184/B) y 12,500 días (N34 y N36) (Tabla 2).



**Figura 2.** A) Procedimiento de carga del reactivo de resazurin en una placa de 96 pocillos; B) Placa resultante después de incubación a 35°C durante cuatro horas con el reactivo de resazurin de semillas de *Solanum lidii*. Mientras que las semillas sanas no alteran el color del resazurin (azul), las semillas envejecidas o muertas producen una decoloración en el pocillo a rosáceo e incoloro, respectivamente.

El porcentaje de germinación varió entre el 16% (N34) y el 87% (184/B) después de 30 días (Figuras 3 y 4). La accesión 184/B que se encontraba almacenada casi 36 años en el banco de semillas a  $-10^{\circ}\text{C}$  fue la que obtuvo mejores porcentajes de germinación (87%), tiempo medio de germinación (9,18 días), velocidad de germinación (11,11 semillas/día) y  $T_{50}$  (6,029 días). 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 días).

El test de resazurin mostró variación en la coloración y absorbancia a 570 nm después de cuatro horas a  $35^{\circ}\text{C}$  en las diferentes accesiones, variando la absorbancia media en las accesiones desde 0,022 a 0,115 (N34 y N36, respectivamente, Tabla 2). 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  $T_{50}$

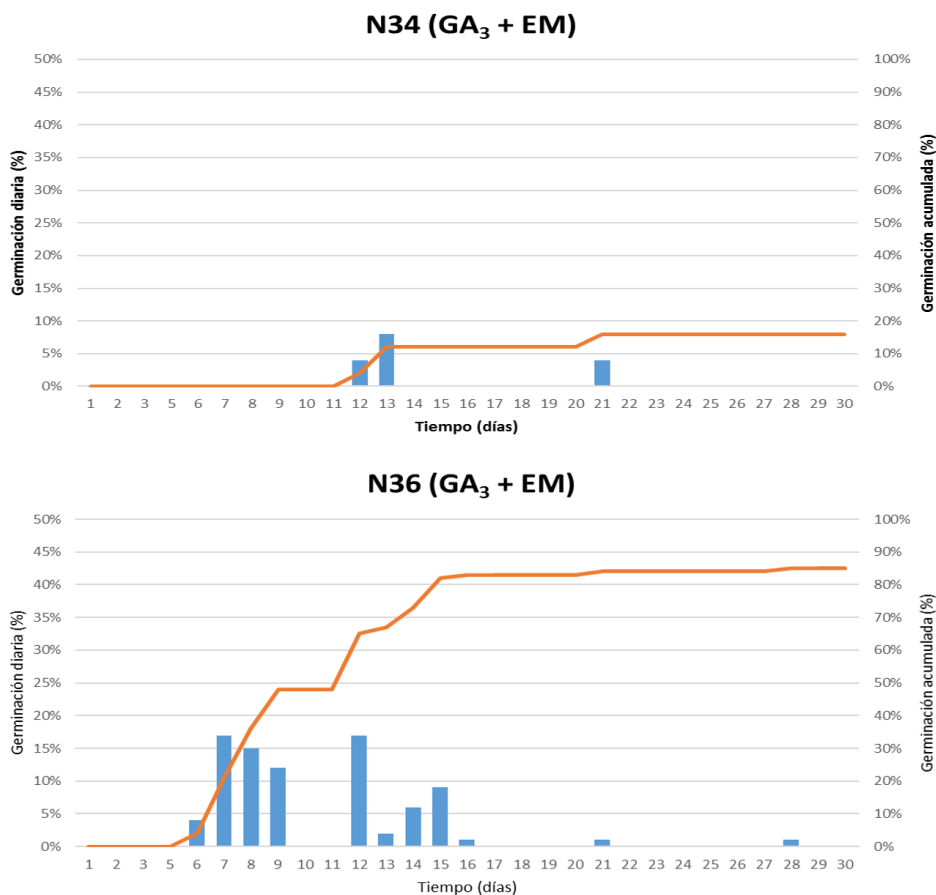
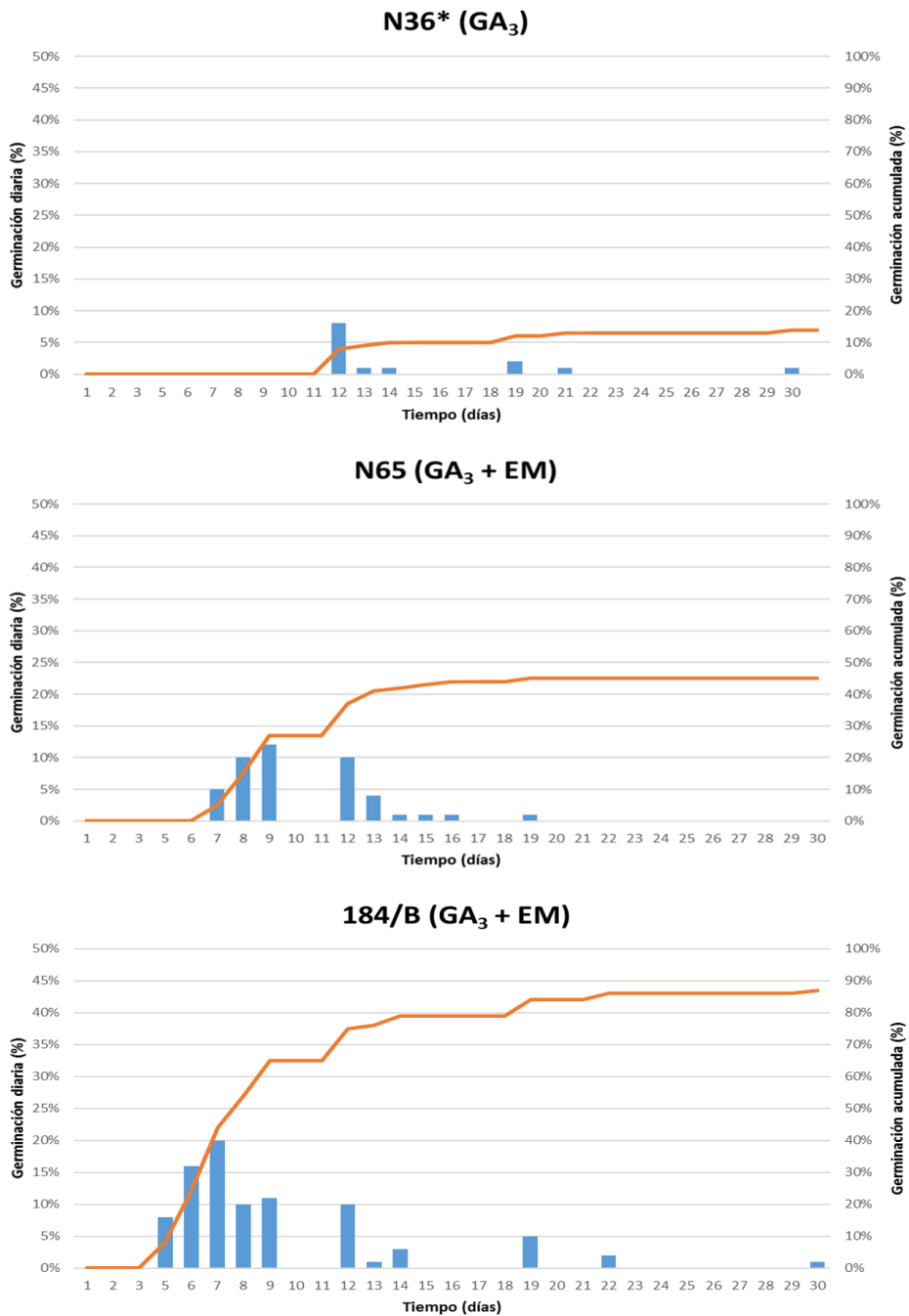


Figura 3. Curvas de germinación de las muestras de *Solanum liliifolium* estudiadas, ensayos N34 y N36.



**Figura 4.** Curvas de germinación de las muestras de *Solanum lidii* estudiadas, ensayos N36\*, N65 y 184/B.



( $r = -0,608$ ,  $p < 0,001$ ) revelaron una correlación negativa con la absorbancia obtenida a 570nm en el test de resazurin (Figura 5).

Por otro lado, en el análisis de ANOVA se detectaron diferencias significativas ( $p < 0,001$ ) entre el porcentaje de germinación de la accesión N36 sin escarificación mecánica (14%) y con escarificación mecánica (85%).

**Tabla 2.** Absorbancia (nm) nanómetros, (%) Porcentaje de germinación, (MGT) tiempo medio de germinación, (GS) velocidad de germinación, y  $T_{50}$  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

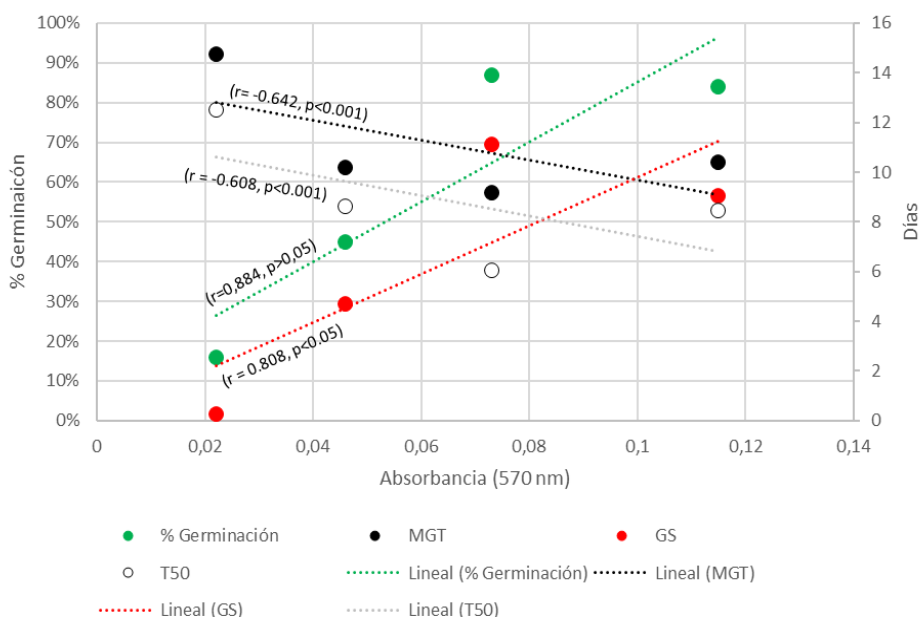
\* sin escarificación mecánica

## DISCUSION

Las semillas depositadas en un Banco de Germoplasma deben ser viables durante el tiempo que estén depositadas, pero además deben existir protocolos de germinación efectivos que garanticen la germinación de las semillas cuando se requiera su utilización, por ejemplo, en planes de recuperación (MAYA *et al.*, 1988).

Los resultados mostraron diferencias significativas ( $p < 0,001$ ) entre los tratamientos sometidos a las semillas, es decir, sin escarificación y con escarificación. Además, la escarificación profunda ha supuesto un claro incremento en el porcentaje de germinación (85%) en relación a las semillas no escarificadas (14%). Las semillas sin escarificar se mantuvieron durante 30 días más en la germinadora bajo las mismas condiciones de horas de luz y temperatura, obteniéndose una germinación total del 17%. La eficacia de la aplicación de la escarificación mecánica en semillas de *Solanum lidii* para su germinación también se comprobó en accesiones con largo tiempo de almacenamiento. En este sentido, 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%) utilizando el protocolo implementado. La viabilidad de las semillas disminuye con el tiempo de almacenamiento debido a cambios químicos que son originados por el metabolismo o los procesos de envejecimiento inherentes en cada ser vivo (PÉREZ-GARCÍA & VILLAMIL, 2001). Por ello, deberíamos esperar una disminución en el porcentaje de germinación de una accesión después de 23 años de almacenamiento. Sin embargo, el nuevo protocolo de germinación de *Solanum lidii* ha conseguido aumentar el éxito germinativo un 31% incluso después de 36 años de almacenamiento.

Por otro lado, estos análisis han mostrado 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. La efectividad de este test rápido, no destructivo y predictivo es relevante para el monitoreo de las colecciones de semillas de los Bancos de Germoplasma, ya que con un pequeño y rápido análisis se puede determinar la viabilidad de las colecciones de semillas, sin necesidad de llevar a cabo pruebas de germinación que requieren mucho tiempo y no son decisivas. Esta es la primera evidencia de la efectividad de la prueba de resazurin en una especie endémica de la región Macaronésica. Así mismo, 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.



**Figura 5.** Representación de la correlación detectada entre la absorbancia a 570 nm resultante del test de resazurin y los diferentes parámetros germinativos analizados. Se muestra la línea de tendencia lineal, así como la correlación y grado de significación de esta.

Los resultados obtenidos en esta investigación vuelven a evidenciar la idoneidad de los protocolos y condiciones de almacenamiento del Banco de Germoplasma del Jardín Botánico Canario "Viera y Clavijo", mostrando altos porcentajes de germinación en semillas almacenadas más de tres décadas en sus instalaciones (184/B). Así mismo, estos resultados muestran que aquellas semillas de *Solanum liddii* almacenadas a temperatura ambiente, aunque con la humedad relativa dentro de ciertos parámetros, pueden mantener una alta viabilidad (85%) después de 20 años. Esto supone otra evidencia de la importancia del contenido de humedad en la conservación de germoplasma (GÓMEZ-CAMPO, 2007). Sin

embargo, también la temperatura es un factor determinante en la conservación del germoplasma como muestran los ensayos en otros endemismos canarios (GONZÁLEZ-PÉREZ *et al.*, 2021), así como multitud de estudios (HARRINGTON, 1972; BACCHETTA *et al.*, 2008). De hecho, la Comisión Internacional para los Recursos Fitogenéticos (IBPGR) ya estableció hace más de cuarenta años las condiciones estándares (5% HR, -18°C) para la conservación de germoplasma a largo plazo (IBPGR, 1976).

Los resultados de los ensayos de germinación en *Solanum lidii* han mostrado también que la viabilidad detectada varía considerablemente entre muestreos de una misma población. Este resultado revela la importancia de disponer de una representación significativa de la variedad genética existente en las poblaciones naturales de cada taxón, lo cual es uno de los objetivos establecidos por el Banco de Germoplasma del Jardín Botánico Canario “Viera y Clavijo”, además de la caracterización del germoplasma depositado en el banco utilizando técnicas moleculares (GONZÁLEZ-PÉREZ & GARCÍA-CABRERA, 2019).

## REFERENCIAS

- ANDERSON, G. J., G. BERNARDELLO, L. BOHS, T. WEESE, & A. SANTOS-GUERRA. 2006.- Phylogeny and biogeography of the Canarian *Solanum vespertilio* and *S. lidii* (Solanaceae). *Anales Jard. Bot. Madrid* 63, no. (2): 159-167.
- BACCHETTA, G., A. BUENO-SÁNCHEZ, G. FENU, B. JIMÉNEZ-ALFARO, E. MATTANA, B. PIOTTO & M. VIREVAIRE (eds.) 2008.- *Conservación ex situ de plantas silvestres*. Principado de Asturias/La Caixa.
- BAÑARES Á., G. BLANCA, J. GÜEMES, J.C. MORENO & S. ORTIZ, eds. 2004.- *Atlas y Libro Rojo de la Flora Vasculare Amenazada de España*. Dirección General de Conservación de la Naturaleza. Madrid
- BROADHURST, L.M., A. LOWE, D.J. COATES, S.A. CUNNINGHAM, M. McDONALD, P.A. VESK & C. YATES, 2008.- Seed supply for broadscale restoration: maximizing evolutionary potential. *Evolutionary Applications* 1: 587-597.
- COOLBEAR, P., A. FRANCIS & D. GRIERSON, 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.
- FUN, Y.B., Z. AHMED & A. DEIDERICHSEN, 2015.- Towards a better monitoring of seed ageing under ex situ seed conservation. *Conservation Physiology* 3: 26
- GAVASSI, M.A., G.C. FERNANDES, C.C. MONTEIRO, L.E.P. PERES. & R.F. CARVALHO, 2014.- Seed germination in tomato: A focus on interaction between phytochromes and gibberellins or abscisic acid. *American Journal of Plant Sciences* 5: 2163-2169.
- GOMEZ-CAMPO, C. 2007.- *A guide to efficient long term seed preservation*. Monographs ETSIA, Universidad Politécnica de Madrid, 170, 1–7.
- GONZÁLEZ-PÉREZ M.A. & N. GARCÍA-CABRERA 2019.- Banco de semillas del Jardín Botánico Canario “Viera y Clavijo”-UACSIC: 35 años conservando la biodiversidad de canarias. *Botánica Macaronésica* 30: 167 – 178.
- GONZÁLEZ-PÉREZ, M.A. & N. GARCÍA-CABRERA & I. CAYÓN-FERNANDEZ 2021.- High seeds viability recorded in an endangered endemic species, *Isoplexis isabelliana* (Webb & Berthel.) Masf. (Scrophulariaceae), after more than 30 years of storage in the Seed Bank. *Mediterranean Botany*.
- IBPGR, 1976.- *Report of IBPGR working group on engineering, design and cost aspects of long-term seed storage facilities*. International Board for Plant Genetic Resources, Rome.
- HARRINGTON J.F. 1972.- Seed storage and longevity. In Kozlowski T.T. (ed.), *Seed Biology*, volume 3. *Insects, and seed collection, storage, testing and certification*, pp. 145-245. New York, Academic Press.
- MAYA, P., A. MONZON & M. PONCE, 1988.- Datos sobre la germinación de especies endémicas canarias. *Botánica Macaronésica* 16: 67-79.
- MELO, F.P.L., A.V. AGUIAR-NETO, E.A. SIMABUKURO, & M. TABARELLI, 2004.- Recrutamento e estabelecimento de plântulas. In Ferreira, A.G. & F. Borghetti (eds.), *Germinação: do Básico ao Aplicado*, pp. 237-249, Artmed, Porto Alegre.

- MIN, T.G. & W.S. KANG, 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., S. BHATTACHARYA & K. MUMMENHOFF, 2019.- Dead or alive: simple, nondestructive, and predictive monitoring of seedbanks. *Trends in Plant Science*, 24 (8): 783-784.
- MYERS, N., R.A. MITTERMEIER, G.A.B. FONSECA & J. KENT, 2000.- Biodiversity hotspots for conservation priorities. *Nature* 403: 853-858.
- PÉREZ GARCÍA, F. & P.J. VILLAMIL, 2001.- *Viabilidad, vigor, longevidad y conservación de semillas*. Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación. España.
- PROHENS, J., G. J. ANDERSON, F. J. HERRAIZ, G. BERNARDELLO, A. SANTOS-GUERRA, D. J. CRAWFORD, & F. NUEZ. 2007.- Genetic diversity and conservation of two endangered eggplant relatives (*Solanum vespertilio* Aiton and *Solanum lidii* Sunding) endemic to the Canary Islands. *Genetic Resources and Crop Evolution* 54: 451–464.
- RODRÍGUEZ DELGADO, O., A. GARCÍA GALLO & G.M. CRUZ TRUJILLO, 2004.- *Solanum lidii* Sunding. In Bañares Baudet A., G. Blanca, J. Güemes, J.C. Moreno & S. Ortiz (eds.), *Atlas y Libro Rojo de la Flora Vasculare Amenazada de España*. 2ª ed.: 504-505. Madrid: Dirección General de Conservación de la Naturaleza.
- RODRÍGUEZ DELGADO, O., A. GARCÍA GALLO & G.M. CRUZ TRUJILLO, 2011.- *Solanum lidii*. *The IUCN Red List of Threatened Species* 2011. <http://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2011-1>. (Bajado el 03 Enero 2020)
- SUNDING, P. 1996.- *Solanum lidii*, a new species of the section *Nycterium* from the Canary Islands. *Saertrykk av Blyttia*, 24: 368-373.