

**CONTRIBUCIÓN A LOS ESTUDIOS DE CONSERVACIÓN DE
SANTOLINA MELIDENSIS (RODR.-OUBIÑA & S. ORTIZ)
RODR.-OUBIÑA & S. ORTIZ***

I. Iglesias, M. C. Feijóo & S. Ortiz

Departamento de Biología Vexetal (Laboratorios de Fisiología Vexetal y Botánica).
Facultade de Farmacia. Universidade de Santiago de Compostela. España.

Iglesias, I., Feijóo, M. C. & Ortiz, S. (2000). Contribution to the conservation studies of *Santolina melidensis* (Rodr.-Oubiña & S. Ortiz) Rodr.-Oubiña & S. Ortiz.. *Portugaliae Acta Biol.* **19**: 107-112.

Santolina melidensis seedlings, an endangered and rare Galician (N. W. Spain) species, were generated from seeds. Optimum germination (97-98 %) was obtained in MS semi-solid medium, without growth regulators, without preimbibition, at 25/15 °C and with a 16 h photoperiod or in total darkness.

Key words: *Santolina melidensis*, *Asteraceae*, aseptic germination, *in vitro* establishment.

Iglesias, I., Feijóo, M. C. & Ortiz, S. (2000). Contribución a los estudios de conservación de *Santolina melidensis* (Rodr.-Oubiña & S. Ortiz) Rodr.-Oubiña & S. Ortiz. *Portugaliae Acta Biol.* **19**: 107-112.

Plántulas de *Santolina melidensis*, una especie rara y amenazada de Galicia (N. O. de España), han sido obtenidas a partir de semillas recogidas directamente del campo. Los mejores valores de germinación (97- 98 %) han sido cuantificados empleando un medio semi-sólido MS (carente de reguladores de crecimiento), sin preimbibición de las semillas incubadas en cámaras de crecimiento a 25/15 °C con un fotoperíodo de 16 h o en oscuridad total.

Palabras clave: *Santolina melidensis*, *Asteraceae*, germinación aséptica, establecimiento *in vitro*.

* Esta línea de trabajo está subvencionada por proyectos concedidos por la Xunta de Galicia XUGA: 20315 B 96 (1996-97) y XUGA: 20314 B 98 (1998-99).

INTRODUCCIÓN

Santolina melidensis es un arbusto de 25-30 cm de altura, de tallos verdosos. Hojas basales: tuberculado-denticuladas, densamente agrupadas en la base del tallo y que corresponden al último ciclo vegetativo. Hojas primarias: pectinado-pinatífidas, agrupadas densamente a lo largo de los siguientes 3-7 mm del tallo y que corresponden al crecimiento temprano primaveral. Hojas caulinares: laxamente agrupadas a lo largo tanto de los tallos floríferos como no floríferos y dando lugar a distintos tipos de series de hojas. Flores amarillo-anaranjadas. (Foto 1).



Foto 1.- *Santolina melidensis* (Rodr.-Oubiña & S. Ortiz) Rodr.-Oubiña & S. Ortiz.

Esta especie se diferencia de *Santolina semidentata* Hoffmanns & Link, que es la especie más próxima tanto morfológica como geográficamente, sobre todo por sus tallos floríferos que son de erecto-patentes a patentes y divergentes entre ellos, y por el número de lóbulos de las hojas primarias, basales y rameales, siendo estas últimas glabras y verde oscuras, además por tener las escamas del receptáculo glabras o con pilosidad muy laxa.

Sus poblaciones están restringidas a una pequeña área en el extremo sur de las serpentinas del área de Melide, en el Centro de Galicia.

Viven en pastizales vivaces que colonizan suelos esqueléticos de las áreas más térmicas de las serpentinas de Melide, en altitudes comprendidas entre 300 y 430 m, en las proximidades del río Ulla. Constituyen esos pastizales vivaces una asociación endémica de los suelos serpentínicos de Galicia denominada *Sagino merinoi-Plantaginietum radicatae* Rodr. Oubiña & S. Ortiz 1991.

Los riesgos que corre esta planta son análogos a los de otros endemismos del afloramiento de rocas ultrabásicas de Melide por efecto de la degradación de esa área debido a la transformación del monte en prados artificiales, construcción de polígonos industriales, urbanizaciones, proliferación de pistas, repoblaciones forestales, entre otras causas.

Santolina melidensis no está protegida directamente por ninguna normativa. Tampoco lo está indirectamente ya que no existe en la actualidad ningún tipo de protección para el área donde está presente esta especie.

El número de semillas que pueden recogerse en el medio natural para los estudios de conservación *ex situ* es limitado y por ello la ya conocida aplicación de determinadas biotécnicas en los citados estudios (IRIONDO & PÉREZ, 1990; FEIJÓO & IGLESIAS, 1998) puede ser de especial interés ya que no han sido empleadas con anterioridad con este taxón.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se parte de semillas recogidas *in situ* que son inmediatamente sometidas a un proceso de esterilización superficial, siguiendo una serie de pasos: se tienen en agua corriente del grifo durante 30 minutos, a continuación se sumergen, con agitación y ultrasonidos, en una solución que contiene captosan al 1% y estreptomicina al 1% durante 15 minutos. Seguidamente las semillas se desinfectan en una solución al 2,5 % (v/v) de lejía comercial (con 50 g.l⁻¹ de cloro activo) con Tween 80 (al 4% v/v) y ultrasonidos durante 10 minutos. Las semillas se aclaran con agua destilada estéril (tres lavados de 10 minutos cada uno).

Finalizada la desinfección se procede a la siembra. Debido a la gran escasez del material de partida se emplearon 20 semillas por experimento, una semilla por tubo de ensayo, y se someten a:

- dos termoperiodos alternantes de temperaturas 15/5 °C y 25/15 °C en presencia de iluminación: fotoperiodo de 16 h día / 8 h noche (tubos fluorescentes de luz fría: 40 μmol m⁻² s⁻¹ - de intensidad lumínica), o bien oscuridad continua, en cada caso con una humedad relativa de 70 ± 5% y una temperatura de 25 ± 2 °C, y con las preimbibiciones de 0 h, 24 h y 48 h. La siembra se realiza en un medio basal semisólido MS (MURASHIGE & SKOOG, 1962) enriquecido con sacarosa (30 g l⁻¹) y agar Difco Bacto-agar (8g l⁻¹). El pH del medio osciló entre 5.6-5.7 y se esterilizó a 120 °C durante 15 minutos.

La emergencia de la radícula se controló semanalmente durante 4 semanas, al cabo de las cuales se evaluó la capacidad germinativa de las semillas y la eficacia del método de desinfección.

Tras esta etapa, las semillas germinadas obtenidas se transfieren a medio fresco a 25/15 °C bajo las condiciones de luz y humedad citadas anteriormente, evaluándose el establecimiento *in vitro* de las vitroplántulas así obtenidas al cabo de 4 semanas (% de supervivencia y aspecto morfológico).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Al igual que suceden con otras compuestas que estamos estudiando paralelamente, todas procedentes de terrenos ultrabásicos, no se conocen tratamientos efectivos de germinación para la especie estudiada y por ello se planificaron diferentes tratamientos con las semillas de *Santolina melidensis*, con el fin de reproducir las condiciones de germinación en sus ambientes naturales, observándose la influencia de los intervalos de temperaturas alternantes, preimbibiciones, condiciones de iluminación y de oscuridad.

A pesar de lo dificultoso que resulta la desinfección de este tipo de semillas se ha logrado establecer un sistema eficiente, obteniéndose valores de contaminación del 0% (Tabla 1), las experiencias que se realizaron muestran que en oscuridad y a 25/15°C las semillas de *Santolina melidensis* comienzan a germinar al cabo de una semana desde su inoculación, en cambio en condiciones de oscuridad a 15/5°C o de luz en los dos termoperíodos estudiados (15/5°C y 25/15°C), la germinación tiene lugar alrededor de una semana más tarde. Sin embargo, en todos los casos la duración global del proceso es la misma, tardando cuatro semanas.

Tabla 1: Porcentaje de contaminación (PC) en semillas de *Santolina melidensis* tras cuatro semanas de germinación *in vitro*. Condiciones: luz (16h luz/8h oscuridad), oscuridad (24h), Termoperíodos (TP) (16h 15°C/8h 5°C), Horas de preimbibición (PI) sobre el porcentaje de germinación (PG).

	LUZ (16 h luz / 8 h oscuridad)							OSCURIDAD (24 h)						
	25°C/15°C			15°C/5°C				TP			25°C/15°C			15°C/5°C
PI (h)	0	24	48	0	24	48	PI (h)	0	24	48	0	24	48	
PC	0	0	0	0	0	1	PC	0	0	0	0	0	0	

No se ha detectado influencia de las preimbibiciones sobre la velocidad o duración del proceso de germinación (Tabla 2), lo que concuerda con lo observado para otras semillas provenientes de otras especies relacionadas (BESNIER, 1989).

Tabla 2: Efecto de la luz (L) (fotoperíodo: 16h luz/8h oscuridad), oscuridad (O) (continua), termoperíodos (TP) (16h 15°C/8h 5°C y 16h 25°C/8h 15°C), número de horas de preimbibición (PI) (0h, 24h y 48h), sobre la porcentaje de germinación (PG) y número de semanas (SG) necesarias para la germinación *in vitro* de *Santolina melidensis*.

	LUZ (16 h luz / 8 h oscuridad)							OSCURIDAD (24 h)						
	15°C/5°C			25°C/15°C				TP			15°C/5°C			25°C/15°C
PI (h)	0	24	48	0	24	48	PI (h)	0	24	48	0	24	48	
PG	68	57	45	97	78	84	PG	69	45	45	98	76	89	
SG	4	4	4	4	4	4	SG	4	4	4	4	4	4	

En el presente estudio se observa que la mayor tasa de germinación se produjo para una temperatura de 25/15°C, con y sin fotoperíodo y sin preimbibición (foto 2), lo cual apuntaría a que en estas circunstancias la humectación previa a la germinación no es necesariamente beneficiosa, lo que coincide con lo indicado por BERJAK et al. (1990) para algunas herbáceas, y al igual que nosotros hemos observado para otras especies de compuestas de hábitat similar; ya que en ciertas

ocasiones se ve mejorada la germinación con menos humedad debido a las características intrínsecas de la semilla.

Se puede apreciar una tasa de germinación superior a temperaturas más elevadas que las existentes en su medio natural; este hecho podría ser explicado según la hipótesis de GARCIA & SUSANNA (1993) en la que originariamente especies, restringidas actualmente a terrenos básicos y ultrabásicos, podrían provenir de zonas más cálidas y secas, mediterráneas, y que cuando las condiciones fueron adversas terminaron colonizando estos terrenos debido a la baja competencia que tienen con otros taxones.

Aunque, no está aún constatado su posible origen, si podemos decir que tiene una amplia distribución mediterránea.

Finalizados los ensayos de germinación y tras el desarrollo de la plúmula, las vitroplántulas son transferidas a un medio fresco y al cabo de dos semanas se comprueba la supervivencia, la cual está comprendida entre un 95-100% y el aspecto morfológico entre 3-4 (Tabla 3, Foto 3).

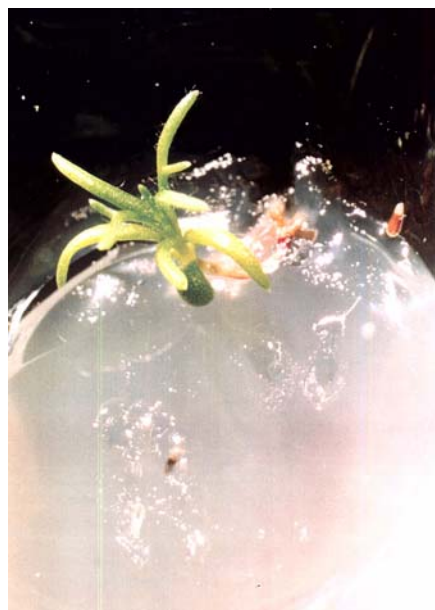


Foto 2.- Plántulas de *Santolina melidensis* (Rodr.-Oubiña & S. Ortiz) Rodr.-Oubiña & S. Ortiz, germinada y desarrollándose *in vitro*, con el primer par de hojas bien visibles.



Foto 3.- Vitroplántulas de *Santolina melidensis* (Rodr.-Oubiña & S. Ortiz) Rodr.-Oubiña & S. Ortiz, fase juvenil vegetativa en medio aséptico.

Un estudio sobre el endurecimiento y paso a tierra de algunas de las vitroplántulas ha dado óptimos resultados: 100% de supervivencia (datos aún no publicados).

Tabla 3: Porcentaje total de supervivencia (%S) y aspecto morfológico (AM) en condiciones de fotoperíodo: luz (L: 16h luz/8h oscuridad), oscuridad (O: 24 h) y con termoperíodo (TP: 25°C/15°C), de las vitroplántulas procedentes de estos tratamientos germinativos. Aspecto morfológico (AM): el 0 corresponde a una plántula muy vitrificada, necrótica o mal formada y el 4: es el valor adjudicado a las plántulas normales y saludables.

% SUPERVIVENCIA	LUZ (16 h luz/8 h oscuridad)	99
	OSCURIDAD (24 h)	100
ASPECTO MORFOLÓGICO	LUZ (16 h luz/8 h oscuridad)	4
	OSCURIDAD (24 h)	4

Investigaciones que estamos realizando actualmente (estudios de multiplicación y enraizamiento *in vitro*, conservación de explantos a baja temperatura $-4^{\circ} \pm 2^{\circ} \text{C}$, tolerancia a iones tóxicos, etc.) están ampliando los datos obtenidos con este trabajo, intentándose establecer un protocolo eficaz de conservación *ex situ* mediante técnicas asépticas con resultados muy alentadores.

BIBLIOGRAFÍA

- BERJAK, P., FERRANT, J. M., PAMMENTER, N. W., 1990.- The basis of recalcitrant seed behaviour, pp. 89-108. En: R. B. Taylorson (ed.), Recent advances in the development and germination of seeds. Plenum Press, New York.
- BESNIER, R. F., 1989.- Semillas: Biología y Tecnología. Mundi-Prensa. Madrid. 637 pp.
- FEIJÓO, M. C., IGLESIAS, I., 1998.- Multiplication of an endangered plant: *Gentiana lutea* L. subsp. *aurantiaca* Laínz, using *in vitro* culture. *Plant Tissue Culture and Biotechnology* 2: 87-94.
- GARCIA, J. N., SUSANNA, A., 1993.- *Centáurea prolongi* and *C. crocata* in Portugal: an old confusion. *Nordic Journal of Botany* 14: 31-38.
- IRIONDO, J. M., PÉREZ, C., 1990.- Micropropagation of an endangered plant species: *Coronopus navasii* (Brassicaceae). *Plant Cell Reports*, 8: 745-748.
- MURASHIGE, T., SKOOG, F., 1962.- A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* 15: 473-497.