

Implicaciones de la viabilidad y germinación de semillas en la conservación de *Aster pyrenaicus* Desf. ex DC. (*Asteraceae*)

Ana Isabel García Torrico^{1*}, Borja Jiménez-Alfaro¹
& Eduardo Fernández Pascual¹

.....

ABSTRACT

Implications of viability and germination on the conservation of *Aster pyrenaicus* Desf. ex DC. (*Asteraceae*)

In this study we analyze the importance of seed germinability in the conservation of *Aster pyrenaicus*, a high priority species of Spain and France. In 2009 we collected fresh seeds in Bulnes (Cordillera Cantábrica) and performed germination tests in conditions of light (photoperiod 12/12 h, constant temperatures of 15, 20, 25 and 30 °C, alternate temperatures of 25/15 °C) and darkness (20 and 25/15 °C). The optimal conditions for germination were then used to analyze the effect of cold stratification (4 weeks at 5 °C). The seeds germinated better in light than in darkness, with a maximum germination rate (> 95%) at 20 °C after both fresh and stratified treatments. In optimal conditions, stratified seeds showed not significant differences with regard to the fresh seeds. The high rates of contaminated seeds during germination and their limited viability suggest the need for a higher effort in refining seed collection and conservation in germplasm banks.

Key words: germination test, seed banks, plant conservation

RESUMEN

En este trabajo se analiza la importancia de la germinabilidad de semillas en la conservación de *Aster pyrenaicus*, especie prioritaria en España y Francia. En el año 2009 recolectamos frutos frescos en la población de Bulnes (Cordillera Cantábrica), realizando pruebas de germinación en condiciones de luz (fotoperiodo 12/12 h a temperaturas constantes a 15, 20, 25 y 30 °C y a temperatura alterna a 25/15 °C) y de oscuridad (a 20 y 25/15 °C). Las condiciones óptimas de germinación se utilizaron para analizar el efecto de una estratificación fría (4 semanas a 5 °C). Los frutos germinaron mejor en luz que en oscuridad, con altas tasas de germinación (> 95%) a 20 °C, tanto en frutos frescos como estratificados. En condiciones óptimas, los frutos sometidos a estratificación no mostraron diferencias significativas respecto a los frescos. Las elevadas tasas de frutos contaminados durante las pruebas de germinación y su reducida viabilidad sugieren la necesidad de un mayor esfuerzo para mejorar la recolección de éstos y su conservación en bancos de germoplasma.

Palabras clave: test de germinación, banco de semillas, conservación vegetal

1. Jardín Botánico Atlántico, INDUROT, Universidad de Oviedo. Av. del Jardín Botánico 2260, E-33394 Gijón

*anaigt@indurot.uniovi.es

Introducción

Aster pyrenaicus, la estrella de los Pirineos, es una planta endémica de los Pirineos franceses y de la Cordillera Cantábrica, de especial interés para la conservación en España y Francia. Es una planta herbácea perenne con tallos de hasta 90 cm, que se encuentra habitualmente en orlas de bosque, a altitudes entre 300 y 900 metros. Su desarrollo comienza en mayo y la floración ocurre entre agosto y septiembre. Cada pie florido produce entre 3 y 6 capítulos terminales de 5 cm de diámetro que pueden presentarse solitarios o en grupos. El fruto, que se desarrolla entre septiembre y octubre, es una cipsela rematada en vilano de pelos desiguales.

En España, *A. pyrenaicus* se considera amenazada bajo la categoría Vulnerable en la Lista Roja de la Flora Vasculare Española (Moreno 2008). Las principales amenazas sobre la especie se basan en la alteración y desaparición de su hábitat (Jiménez-Alfaro et al. 2004) por lo que las estrategias de conservación de la especie incluyen la preservación de sus semillas (en realidad, del fruto completo) en bancos de germoplasma. La principal ventaja de la conservación *ex situ* es que el material recolectado durante varios años puede ser utilizado en el futuro para su reintroducción en el hábitat natural, el análisis sobre la biología de la especie u otras actividades relacionadas (Guerrant et al. 2004). Para ello es necesario evaluar la germinabilidad (*sensu* Black et al. 2008) de los frutos recolectados y su capacidad para conservarlos a largo plazo.

El principal objetivo de este trabajo es caracterizar el potencial germinativo de la principal población cantábrica de *A. pyrenaicus*. Para ello analizamos la germinabilidad de sus semillas en función de (i) su respuesta a diferentes temperaturas, (ii) presencia/ausencia de luz, y (iii) resistencia a un periodo de alta humedad y frío.

Material y métodos

RECOLECCIÓN

Se utilizaron frutos recolectados en el año 2009 en la principal población de *A. pyrenaicus* de la Cordillera Cantábrica (Bulnes, España), durante el momento de máxima fructificación, y realizando un muestreo regular a lo largo del área de ocupación de la población (recogiendo un único capítulo por individuo). En el mismo día de recolección, los frutos se llevaron al laboratorio, donde fueron sometidos a un proceso de postmaduración durante los 15 días siguientes, en un lugar aireado y relativamente seco (25 °C, 30% de humedad relativa). Posteriormente se limpiaron eliminando restos vegetales y otras impurezas, y se sometieron a un proceso de desecado a 15% HR en una cámara estanca. Una parte de los frutos se utilizaron para realizar los ensayos de germinación, mientras que el resto se almacenaron en tubos de ensayo con gel de sílice (3% HR) y a una temperatura de -13 °C, con el fin de conservarlos durante un largo tiempo.

CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA

Los frutos se clasificaron en tres grupos morfológicos (fig. 1): (i) frutos de mayor tamaño y oscuros, obovoides ligeramente comprimidos, eran rígidos, y parecían contener cada uno una semilla con embrión viable; (ii) frutos de mayor tamaño (tamaño semejante al anterior grupo), y con características similares a los anteriores pero que presentaban una coloración clara; (iii) frutos de menor tamaño, cilíndricos/subcilíndricos, algo comprimidos, pudiendo plegarse fácilmente y que se consideraron claramente no viables por la ausencia de embrión o endospermo en su semilla. Esta clasificación coincide con las observaciones de García (2004) en la caracterización de frutos procedentes de las poblaciones francesas de la especie.



FIGURA 1. Caracterización morfológica de los frutos de *Aster pyrenaicus*: tamaño normal y color oscuro (1), tamaño normal y color claro (2), pequeña y no viable (3).

PRUEBAS DE GERMINACIÓN

Los frutos se sembraron en placas de Petri (90 mm de diámetro) con medio que contenía agar 1% (p/v) en agua destilada. Siempre se utilizaron 4 placas a modo de réplica con 25 frutos cada una, y se sellaron con parafilm para evitar contaminación externa y desecación. Antes de cada siembra, los frutos se sumergieron en hipoclorito de sodio (40 g/L cloro activo) a una concentración del 20% durante 5 minutos para evitar el rápido crecimiento de hongos, ya que la especie tiene alta susceptibilidad a este tipo de contaminación. Una vez lavados con agua destilada y sembrados en placas, se revisaba la germinación de sus propias semillas tres veces a la semana (lunes, miércoles y viernes), eliminando aquellas que habían germinado. Se consideró como criterio de germinación la emergencia de una radícula ≥ 1 mm. La germinación en todos los ensayos se realizaba en cámaras para tal fin programadas con un fotoperiodo de 12 horas de luz y 12 de oscuridad, y una radiación aproximada de 40 micromoles \cdot m $^{-2}$ \cdot s $^{-1}$. Se consideraba finalizado el ensayo una semana después de la última germinación.

En ese momento se realizaba la prueba de corte, que consistía en cortar con un escalpelo los frutos que quedaban sin germinar en la placa para observar el estado de la semilla de cada uno de ellos. Las semillas se clasificaban como normal, contaminada o vacía (Gosling *et al.* 2003). A partir de estos datos, se corregía el dato de germinación respecto a la viabilidad (Germinación total = Germinadas / Germinadas + Normales). De este modo, semillas Germinadas + Normales se consideraron como Viables, mientras que las semillas Contaminadas y Vacías tras la prueba de corte se consideraron No Viables.

DISEÑO EXPERIMENTAL Y ANÁLISIS DE DATOS

Mediante una prueba ANOVA se evaluó la existencia de diferencias significativas en la longitud y anchura de los grupos morfológicos definidos, tomando para ello una muestra aleatoria de 10 frutos de cada grupo a modo de réplica.

Se evaluó la respuesta germinativa en condiciones de luz (fotoperiodo 12/12h a temperaturas constantes de 15, 20, 25 y 30 °C y temperatura alterna de 25/15 °C), y oscuridad (20 y 25/15 °C). Además, se analizó el efecto de una estratificación fría y húmeda (4 semanas a 5 °C previo al ensayo de germinación).

Para determinar si las diferencias entre los diferentes tratamientos eran estadísticamente significativas, se ajustaron modelos lineales generalizados (GLM) con distribución de error binomial y la función de enlace logit. Para ello, los tratamientos experimentales actuaban como predictores y el número de frutos germinados en cada tratamiento como variable respuesta.

Resultados

Los tres grupos morfológicos presentaron diferencias significativas en cuanto a su longitud y anchura (ANOVA; $p < 0,05$). El grupo más numeroso fue el de frutos de menor tamaño y no viables (44,01%), seguido del grupo de frutos de mayor tamaño y oscuros (33,39%) y del de frutos de mayor tamaño y claros (22,60%). En cuanto a su capacidad germinativa, se observó una enorme diferencia entre las de mayor tamaño y las más pequeñas (tabla 1). Dentro del grupo de las semillas de tamaño normal la germinación fue semejante ($p = 0,698$), pero resultaron significativamente más viables el grupo de semillas oscuras que el de claras ($p = 0,020$).

TABLA 1. Datos de germinación y viabilidad para las tres morfologías de las semillas de *A. pyrenaicus*.

| Morfología | Viables | Contaminadas | Vacías | Germinación Total |
|-----------------|---------|--------------|--------|-------------------|
| Normal y oscura | 36 ± 4 | 53 ± 3 | 11 ± 5 | 96 ± 4 |
| Normal y clara | 21 ± 3 | 42 ± 3 | 37 ± 4 | 96 ± 4 |
| Pequeña | 0 ± 0 | 1 ± 1 | 99 ± 1 | 0 ± 0 |

Los frutos germinaron mejor en condiciones de luz que en oscuridad (fig. 2a) para las dos temperaturas testadas. La temperatura óptima de germinación fue de 20 °C (fig. 2b), mostrando diferencias significativas respecto al resto de temperaturas ($p < 0,001$) excepto a 25/15 °C ($p = 0,196$). El número medio de frutos no viables fue del 44,4%, de las cuales un 25,7% se identificaron como frutos contaminados y un 18,7% como vacíos.

La estratificación fría aumentó la velocidad de germinación tanto a 20 °C (fig. 3) como a 15 °C. Sin embargo, no se detectaron diferencias significativas en la viabilidad de los frutos en ambos tratamientos ($p = 0,5711$ para 20 °C; $p = 0,392$ para 15 °C).

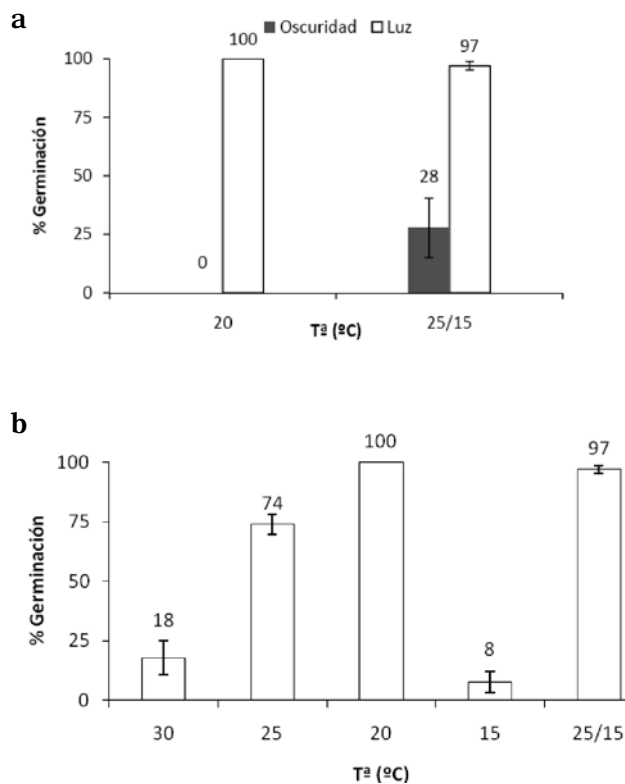


FIGURA 2. Resultados en germinación de *Aster pyrenaicus* para comparar la respuesta a los tratamientos de luz y oscuridad (a), y la respuestas a las temperaturas constantes 30, 25, 20 y 15 °C y a la temperatura alterna 25/15°C (b).

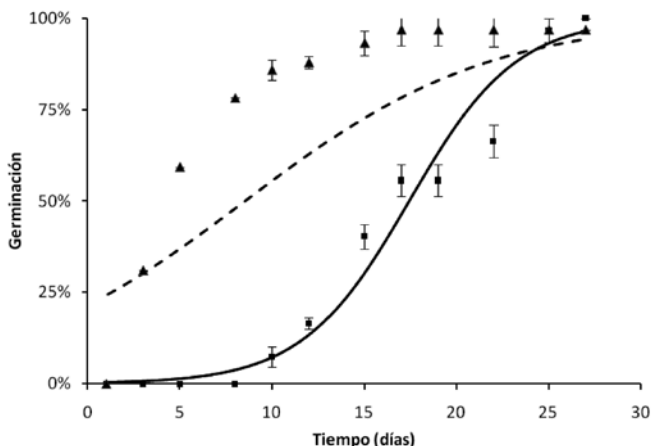


FIGURA 3. Resultados de germinación de semillas de *Aster pyrenaicus* frescas (línea continua) y estratificadas (línea discontinua) a 20 °C; estas líneas representan la función logística ajustada por el modelo GLM. Los puntos cuadrados representan la germinación media \pm SE de cuatro placas para las semillas frescas, y los triangulares para las estratificadas.

Discusión

Los ensayos de germinación realizados en la población de *Aster pyrenaicus* indican que las condiciones óptimas de germinación requieren condiciones de luz con fotoperiodo 12 horas de luz y 12 de oscuridad, a una temperatura media de 20°C independientemente del termoperiodo. Estos requerimientos se asemejan a las condiciones ambientales que los frutos encuentran en el momento de su dispersión, lo que concuerda con el carácter oportunista de la especie. Sin embargo, los estudios realizados en las poblaciones pirenaicas (Cambecèdes & Largier 2006) sugieren que las condiciones óptimas para su germinación requieren oscuridad y temperaturas más bajas. Considerando que hay ciertas características ecológicas de las poblaciones francesas y españolas que parecen diferenciar el hábitat natural de las mismas (Jiménez-Alfaro *et al.* 2005) es posible que estas diferencias se deban a una adaptación ecofisiológica relacionada con la adaptación local al hábitat (Pérez-García *et al.* 1995). Sin embargo, para confirmar esta hipótesis sería necesario realizar un estudio comparado de germinabilidad en las poblaciones cantábricas y pirenaicas, considerando además una posible relación con la variabilidad genética de la especie.

Aunque en un inicio era esperable que el paso por una fase de alta humedad afectase negativamente a la viabilidad de sus semillas, debido a la prolifera-

ción de hongos, se comprobó que un periodo de estratificación fría y húmeda no afecta en absoluto a su viabilidad, acelerando notablemente la velocidad de germinación. A este efecto se suma un aumento de la ventana de germinación después de la estratificación, como posible mecanismo que favorece la germinación en un rango de condiciones ambientales más amplio. En condiciones naturales, esta respuesta implicaría que una vez dispersados, los frutos que no pudieron germinar durante el otoño lo harían en cualquier momento del final del invierno o primavera, como respuesta esperable de una especie que no forma bancos de semillas del suelo permanentes. Sin embargo, el elevado número de semillas reconocidas como no viables, junto con las elevadas tasas de contaminación en laboratorio, sugieren que el porcentaje de frutos finalmente disponibles para el reclutamiento demográfico de la población es muy escaso.

En conclusión, los resultados de este estudio indican que los esfuerzos de recolección y conservación *ex situ* de frutos de *A. pyrenaeus* requieren de una mayor dedicación que la inicialmente esperada, considerando el reducido número de frutos potencialmente útiles para su utilización. Una vez recolectadas y adecuadamente conservadas, la germinación de las semillas no ofrece especial dificultad, debido a la ausencia de cualquier tipo de dormición.

Agradecimientos

El presente estudio recibió financiación de la Fundación Biodiversidad a través del proyecto “Conservación *ex situ* de plantas amenazadas de máxima prioridad en el norte peninsular: *Aster pyrenaeus* y *Centaureium somedanum*”. También nos gustaría agradecer el apoyo del Parque Nacional Picos de Europa.

Bibliografía

- BLACK, M., BEWLEY, J. D. & HALMER, P. (eds). 2006. *The Encyclopedia of Seeds. Science, Technology and Uses*. CABI Publishing, Wallingford, UK. 828 pp.
- CAMBECEDES J. & LARGIER G. 2006. *Plan de restauration nacional de l'Aster des Pyrénées (Aster pyrenaeus DC.)*. *Recueil des connaissances*. Conservatoire botanique pyrénéen. 89 pp.
- GARCÍA, J. 2004. *Contribution à l'étude de la biologie de la reproduction de l'Aster des Pyrénées: pollinisations expérimentales au sein d'une population cultivée au Conservatoire botanique pyrénéen*. Rapport d'étude, 13pp.
- GOSLING P. G., 2003. Viability testing. In: Smith RD, Dickie J.B., Linington S.H., Pritchard H.W. & Probert R.J. (eds), *Seed Conservation: turning science into practice*: 447-481. The Royal Botanic Gardens, Kew. The Cromwell Press Ltd., London
- GUERRANT E. O., HAVENS K. & MAUNDER M. (eds.). 2004. *Ex situ plant conservation: supporting species survival in the wild*. Island Press, Washington DC. 504 pp.
- JIMÉNEZ-ÁLFARO, B., BUENO SÁNCHEZ, A., FERNÁNDEZ PRIETO, J. A. & ALONSO FELPETE, I. 2004. *Aster pyrenaeus* DC. In: Bañares Á., Blanca G., Güemes J., Moreno J.C. & Ortiz S. (eds.), *Atlas y Libro Rojo de la Flora Vascular Amenazada de España*. Dirección General de Conservación de la Naturaleza, Madrid. 1069 pp.

- JIMÉNEZ-ALFARO B., BUENO S. A. & FERNÁNDEZ PRIETO J.A. 2005. Ecología y hábitat potencial de las poblaciones cantábricas de *Aster pyrenaicus* D.C. (Asteraceae). *Bull. Soc. Hist. Nat. Toulouse* 141(2): 203-208.
- MORENO, J.C., (coord.) 2008. *Lista Roja 2008 de la flora vascular española*. Dirección General de Medio Natural y Política Forestal (Ministerio de Medio Ambiente, y Medio Rural y Marino, y Sociedad Española de Biología de la Conservación de Plantas, Madrid. 86 pp.
- PÉREZ GARCÍA, F., IRIONDO J. M., GONZÁLEZ BENITO M. E., CARNES L. F., TAPIA J., PRIETO C., PLAZA R. & PÉREZ C. 1995. Germination studies in endemic plant species of the Iberian Peninsula. *Israel Journal of Plant Sciences* 43: 239-247.