

CONTRIBUCIÓN A LOS ESTUDIOS DE CONSERVACIÓN DE *LEUCANTHEMUM GALLAECICUM* RODR.-OUBIÑA & S. ORTIZ*

M. C. Feijóo, I. Iglesias & J. Rodríguez-Oubiña

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

Feijóo, M. C., Iglesias, I. & Rodríguez-Oubiña, J. (2000).
Contribution to the conservation studies of *Leucanthemum
gallaecicum* Rodr.-Oubiña & S. Ortiz. *Portugaliae Acta Biol.*
19: 113-119.

In situ seeds of *Leucanthemum gallaecicum*, a wild rare and
endangered Galician (N.W. Spain) species were successfully
germinated and established *in vitro*. Surface sterilization of
seeds from the field was obtained at 0% contamination with
2.5 % v/v commercial bleach, 1 % p/v captosan and 1 % p/v
streptomycin. Then they were germinated on a semi-solid MS
medium without growth regulators; the first results were
obtained after 7 days and the essay was stopped at the 30th
day with a 98 % success. The optimal incubation conditions
are: no preimbibition, 25/15°C and 16 h photoperiod. Vigour
of the growing plantlets was totally satisfactory. The
successfull use of cell culture techniques for conservation of
wild *Leuncantemum gallaecicum* allows further *ex situ*
conservation studies on this taxon.

Key words: *Leucanthemum gallaecicum*, *Asteraceae*, aseptic
germination, *in vitro* establishment.

Feijóo, M. C., Iglesias, I. & Rodríguez-Oubiña, J. (2000).
Contribución a los estudios de conservación de
Leucanthemum gallaecicum Rodr.-Oubiña & S. Ortiz.
Portugaliae Acta Biol. **19**: 113-119.

Las semillas recogidas *in situ* de *Leuncanthemum
gallaecicum*, planta salvaje rara y amenazada de Galicia
(N.O. de España), fueron germinadas con éxito y las plántulas

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

así obtenidas se han establecido óptimamente en condiciones asépticas. La esterilización superficial lograda con las semillas procedentes directamente del campo, con 2.5 % v/v de lejía comercial y 1% p/v del captosan con estreptomicina, da un 0 % de contaminación.

Las semillas fueron posteriormente germinadas en un medio MS semi-sólido carente de reguladores de crecimiento, obteniéndose los primeros resultados a los 7 días y completándose el experimento a los 30 días, con un 98 % de éxito, a las condiciones de incubación consideradas como las mejores de todas las ensayadas: 0 h de preimbibición y 25/15 °C y 16 h de fotoperiodo.

El vigor de las vitro-plántulas obtenidas fue totalmente satisfactorio. Por esto, la posibilidad del empleo de las técnicas de cultivo de tejidos a la conservación *ex situ* del taxón estudiado, nos permite continuar con las investigaciones sobre el tema.

Palabras clave: *Leucanthemum gallaecicum*, Asteraceae, germinación aséptica, establecimiento *in vitro*.

INTRODUCCIÓN

Leucanthemum gallaecicum es una planta perenne de 15-18 cm de altura, con rizoma de tuberculoso a estolonífero, con hojas basales ovaladas, estrechas; flores blancas (del radio) y flores amarillentas (del disco) (Foto 1).

Esta especie está restringida al área de suelos serpentínicos del Centro de Galicia, las conocidas como serpentinas de Melide. Sus poblaciones son escasas en diversos puntos de dicho afloramiento, siendo de vital importancia las medidas a tomar para su conservación.



Foto 1.-
*Leucanthemum
gallaecicum*
Rodr.- Oubiña
& S. Ortiz.

Vive en pastizales y en determinados claros del matorral, emplazados en los tojales con *Erica vagans* L. conocidas como *Ulici europaei-Ericetum cinereae* Bellot 1949 subass. *ericetosum vagantis* Rodr.-Oubiña & S. Ortiz ined. que parecen estar favorecidos por los incendios frecuentes de la zona, ya que, al igual que ocurre con muchas especies pioneras de poco porte, se ven desplazadas por otras especies de más biomasa, en la competencia por la luz y los nutrientes del suelo, por lo que un incendio elimina temporalmente las plantas de mayor porte y permite la recuperación, al menos momentánea, de las poblaciones de *Leucanthemum gallaecicum*.

Leucanthemum gallaecicum 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.

Es conocida la utilidad de las técnicas de cultivo aséptico aplicadas a la conservación de especies vegetales (IRIONDO & PÉREZ, 1990) y una de sus aplicaciones consiste en lograr mejorar o asegurar la germinación de semillas potencialmente recalcitrantes a la misma, provenientes de taxones salvajes.

MATERIAL Y MÉTODOS

Las semillas fueron recogidas en su habitat natural, siendo sometidas a 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 estreptomycin 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, una semilla por tubo de ensayo, empleándose 20 tubos para cada experimento, y se someten a dos termoperiodos alternantes de temperaturas 15/5°C y 25/15°C en presencia de iluminación: fotoperiodo 16 h día / 8 h noche (tubos fluorescentes de luz fría: 40 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ de intensidad lumínica, una humedad relativa de 70 \pm 5% y una temperatura de 25 \pm 2 °C) u oscuridad continua, y con las preimbibiciones de 0 h, 24 h y 48 h. La siembra se realiza en un medio basal semisólido (MURASHIGE & SKOOG, 1962) enriquecido con sacarosa (30 g/l) y agar Difco Bacto-agar (8 g/l). 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 luz (tubos fluorescentes de luz fría: 40 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ de intensidad lumínica, una humedad relativa de 70 \pm 5% y una temperatura de 25 \pm 2 °C), evaluándose el establecimiento *in vitro* de las vitroplantulas así obtenidas al cabo de 4 semanas (% supervivencia y aspecto morfológico).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Como no se conocen tratamientos efectivos de germinación para la especie estudiada, se realizaron diferentes pruebas con las distintas semillas, algunas 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.

Tras establecer un eficiente sistema de desinfección (obteniendo valores de contaminación de prácticamente el 0% (Tabla 2), las experiencias que se realizan muestran que en oscuridad y a 25/15°C *Leucanthemum gallaecicum* comienzan a germinar al cabo de una semana desde su inoculación, en condiciones de oscuridad a 15/5°C o de luz a ambas temperaturas 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. No se ha detectado influencia de las preimbibiciones sobre la velocidad o duración del proceso de germinación (Tabla 1), lo que concuerda con lo observado para otras semillas provenientes de especies contaminadas fisiologicamente (BESNIER,1989).

Tabla 1 - Efecto de la LUZ (fotoperíodo: 16 h luz/8 h oscuridad) /OSCURIDAD (continua), TERMOPERÍODOS (16 h 15°C/8h 5°C y 16 h 25°C/8h 15°C), HORAS DE PREIMBIBICIÓN sobre el PORCENTAJE DE GERMINACIÓN y NÚMERO DE SEMANAS necesarias para *Leucanthemum gallaecicum* estudiadas *in vitro*. PI: Preimbibición.

LUZ	15/5°C	PI: 0 h	60
		PI: 24 h	40
		PI: 48 h	35
	SEMANAS DE GERMINACIÓN	4	
	25/15°C	PI: 0 h	98
		PI: 24 h	66
PI: 48 h		74	
SEMANAS DE GERMINACIÓN	4		
OSCURIDAD	15/5°C	PI: 0 h	68
		PI: 24 h	40
		PI: 48 h	35
	SEMANAS DE GERMINACIÓN	4	
	25/15°C	PI: 0 h	98
		PI: 24 h	68
PI: 48 h		73	
SEMANAS DE GERMINACIÓN	4		

En el presente estudio se observa que la mayor tasa de germinación se producía para una temperatura de 25/15°C, en oscuridad y sin periodo de

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, ya que en ciertas ocasiones se ve mejorada la germinación con menos humedad debido a las características intrínsecas de la semilla.

Tabla 2 - Porcentaje de CONTAMINACIÓN de *Leucanthemum gallaecicum in vitro*, al finalizar el período de germinación (Véanse condiciones en Tabla 1). PI: Peimbibición.

LUZ	15/5 °C	PI: 0 h	0
		PI: 24 h	0
		PI: 48 h	0
	SEMANAS DE GERMINACIÓN	4	
	25/15 °C	PI: 0 h	0
		PI: 24 h	0
PI: 48 h		0	
SEMANAS DE GERMINACIÓN	4		
OSCURIDAD	15/5 °C	PI: 0 h	0
		PI: 24 h	0
		PI: 48 h	3
	SEMANAS DE GERMINACIÓN	4	
	25/15 °C	PI: 0 h	0
		PI: 24 h	0
PI: 48 h		0	
SEMANAS DE GERMINACIÓN	4		



Foto 2.- Semillas de *Leucanthemum gallaecicum* Rodr.- Oubiña & S. Ortiz, recientemente germinadas, comenzando su desarrollo. Se observa claramente los cotiledones, la plúmula y las raíces.

Se puede apreciar una tasa de germinación superior a temperaturas más elevadas que las existentes en sus habitats naturales; 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 constatado aún 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).

Un estudio sobre el endurecimiento y paso a tierra de las vitroplantas ha dado óptimos resultados (100% de supervivencia).

Experimentos en curso están orientados hacia el establecimiento de un sistema eficaz de conservación *ex situ* mediante técnicas asépticas, con resultados esperanzadores.

Tabla 3 - Porcentaje total de SUPERVIVENCIA Y ASPECTO MORFOLÓGICO en condiciones de fotoperíodo (16h luz/8h oscuridad) y termoperíodo (25/15°C) de las vitroplántulas provenientes de los diferentes tratamientos germinativos (ver Tabla 1) correspondientes a la especie estudiada. Aspecto morfológico 0: plántula muy vitrificada, necrótica y/o mal formada; aspecto morfológico 4: plántula totalmente normal y saludable.

% SUPERVIVENCIA	LUZ	100
	OSCURIDAD	99
ASPECTO MORFOLÓGICO	LUZ	4
	OSCURIDAD	3



3A

Foto 3.
A.- Vitroplántulas de *Leucanthemum gallaenicum* Rodr.- Oubiña & S. Ortiz.



3B

B.- Vitroplántulas de *Leucanthemum gallaenicum* Rodr.- Oubiña & S. Ortiz, pasadas a tierra.

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*. De. Mundi-Prensa. Madrid. 637 pp.
- GARCIA, J. N., SUSANNA, A., 1993.- *Centaurea 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.