

MÉTODOS RÁPIDOS PARA EVALUAR LA CAPACIDAD GERMINATIVA DE LAS SEMILLAS DE *QUERCUS SUBER* L.

E. SOBRINO (1), J. M. SORIANO (1), A.B. VIVIANI (1), A. GONZALEZ (2), D. MINGOT (1)

- (1) Departamento de Producción Vegetal: Botánica y Protección Vegetal. Escuela Técnica Superior Ingenieros Agrónomos. Ciudad Universitaria. 28040 Madrid.
- (2) Instituto de Investigaciones Agrarias y Alimentarias (INIA) C.^a de La Coruña km. 7,500. 28040 Madrid

RESUMEN

El alcornoque (*Quercus suber* L.) posee semillas recalcitrantes, de forma que en ausencia de adecuados métodos de conservación, pierde con rapidez la capacidad germinativa. La metodología de análisis de germinación propuesta por la ISTA, es lo suficientemente prolongada para que durante ese tiempo la capacidad germinativa pueda reducirse sustancialmente. Por este motivo, con objeto de poder estimar en tiempo real o casi real, la capacidad germinativa de lotes de semilla, se estudian y comparan diferentes métodos sencillos y rápidos, estableciéndose la curva de regresión y el coeficiente de correlación entre los métodos propuestos y la capacidad germinativa obtenida experimentalmente con la metodología ISTA, para semilla envejecida entre 0 y 12 días a 30°C y 33% de humedad relativa.

Los métodos propuestos que presentan niveles más elevados, en las condiciones experimentales, con los modelos de ajuste por regresión propuestos, son el contenido de humedad de la bellota con una función lineal ($r=0,98$), el pH de los cotiledones con una función lineal ($r=0,97$), la respiración aparente de las bellotas con una función parabólica ($r=0,97$) y la densidad de la bellota con una función parabólica ($r=0,97$).

P.C.: *Quercus suber*, germinación, semilla recalcitrante, test rápido de germinación.

SUMMARY

The cork oak (*Q. Suber* L.) has recalcitrant seeds, therefore without proper conservation methods, the seeds quickly loose the germinating capacity. The germination analysis methodology proposed by ISTA takes a long time in order that the germinating capacity may be reduced substantially. With the object of estimating in real or nearly real time, the germinating capacity of seed lots, different methods which are quick and easy are studied and compared. Regression curves and correlation coefficients are established between the proposed methods and germinating capacity, obtained experimentally with ISTA methodology. The methods use seeds between 0 and 12 days old at 30°C and 33% of relative humidity.

The proposed methods which present higher levels, (in experimental conditions and with the Regression adjusted methods obtained) are: the acorns' humidity content with a linear function ($r= 0,98$), the cotyledons' pH with a lineal function ($r= -0,98$), the acorns' apparent respiration with a parabolic function ($r= 0,97$) and the acorns' density with a parabolic function ($r= 0,97$).

K.W.: *Quercus suber*, germination, recalcitrant seed, quick germination-test

INTRODUCCIÓN:

Las bellotas son los frutos del alcornoque (*Quercus suber* L.), en nuez monospermica, y contienen una gruesa semilla recalcitrante (BONNER, 1990; ZULUETA & MONTOTO, 1992; SANTOS & BERNARDINI, 1995). El termino semillas recalcitrantes fue propuesto por ROBERTS (1973) en oposición al de semillas ortodoxas. Las semillas recalcitrantes son aquellas que pierden su viabilidad cuando su contenido de humedad desciende por debajo del rango 12-31% sobre peso seco. Alternativamente HANSON (1984) ha usado otra terminología para describir el mismo fenómeno, dividiendo las semillas en sensibles a la desecación y no sensibles.

Consideramos que es preciso disponer de semillas de elevada capacidad germinativa para llevar a cabo eficazmente las acciones de recuperación de los alcornocales. Por un lado es preciso disponer de métodos adecuados para la conservación de la semilla y conjuntamente como soporte métodos rápidos de control, que informen sobre la capacidad germinativa, que proporcionen esta información en condiciones casi de tiempo real.

Hay que tener en cuenta que en condiciones desfavorables, e incluso en muchas condiciones normales de conservación, las semillas de alcornoque pierden con extrema rapidez la capacidad de germinativa. El método propuesto por ISTA (1993), son precisas veintiocho días. En concreto este método es el que se ha tomado como referencia, para generar en detalle el siguiente procedimiento, que ha sido utilizado en el Proyecto FAIR5-CT97-3480, "Optimization of cork oak seed management in support of Community policies for reforestation and cork production". 1) Sumergir las bellotas 48 horas en agua destilada. 2) Cortar las bellotas a un tercio de la zona final y eliminar el pericarpio. 3) Sembrar las bellotas húmedas en bandejas con arena húmeda esterilizada, con 60% del agua de saturación. 4) Colocar las bandejas en cámara a 20°C y oscuridad. 5) Reponer el agua evaporada. 6) Realizar conteos cada dos días hasta los 28 días.

Con objeto de proponer métodos validos para el análisis rápido de la capacidad germinativa se han comparado varios métodos rápidos utilizando como referente (validez externa) el valor de la germinación por el método ISTA (1993), de forma que se han utilizado las siguientes hipótesis de trabajo realizadas sobre una muestra de semillas envejecidas aceleradamente. 1) El valor de la respiración aparente se encuentra estrechamente relacionada con la capacidad germinativa determinada por el método ISTA (1993). 2) El pH de los cotiledones se relaciona con el índice de validez externa, la capacidad germinativa. 3) El porcentaje de germinación se correlaciona con el contenido en humedad de la semilla. 4) La densidad de la bellota esta correlacionada con la capacidad germinativa. 5) El índice de flotabilidad y el volumen de la cámara de desecación de la bellota se relacionan con el porcentaje de germinación.

Todos los métodos se han seleccionado por su sencillez de realización, el bajo nivel de tiempo necesario para su ejecución y la rapidez de obtención de resultados.

MATERIAL Y MÉTODOS

General

Las bellotas utilizadas en los diversos experimentos fueron recolectadas de una dehesa de alcornoque en Jaraicejo (Cáceres) durante el mes de diciembre. Se recolectaron bellotas plenamente maduras, con dos días como máximo desde su caída del árbol a la recolección. Para ello se dispusieron lonas debajo de los arboles recogiendo las bellotas cada dos días. Se utilizaron semillas libres de hongos en el pericarpio, previo examen individual con lupa estereoscópica Zeiss, sin ningún tratamiento fungicida para evitar la aparición de influencias no controladas. La simulación de semillas envejecidas se realizó sometiendo a una muestra de semillas a condiciones de desecación acelerada a 30°C y 33% humedad relativa (HR), tomando submuestras en el momento inicial y posteriormente a los 3, 6, 9, 12 días para la realización de los diferentes análisis.

Determinación de la capacidad germinativa

Se determinó la capacidad germinativa de una submuestra del lote de aquenios, utilizando el método ISTA (1993). Se realizó sobre cuatro repeticiones de 25 semillas cada una. El valor medio de la capacidad germinativa (%) fue utilizado como índice externo para realizar las comparaciones y estudio de correlación con los valores obtenidos de los diferentes nuevos métodos propuestos.

Determinación de la respiración aparente

Se determinó la actividad respiratoria aparente producida durante 24 horas a 20°C sobre la atmósfera de confinamiento en contenedores de 400 ml con cinco bellotas (peso medio total 25,5 g y volumen medio total de 4,5 ml) y tres repeticiones mediante cromatografía de gases utilizando la metodología de MERODIO & DE LA PLAZA (1989) analizando simultáneamente oxígeno, nitrógeno y dióxido de carbono. El cromatógrafo de gases se verifico previamente a la realización de los análisis mediante una mezcla conocida de gases (nitrógeno, oxígeno y dióxido de carbono). Se realizaron las medidas sobre submuestras testigo (0 días) y envejecidas 3, 6, 9 y 12 días en las condiciones indicadas.

Determinación del pH

Para la determinación del pH de los cotiledones se utilizo un pHmetro Crison con una sonda

par materiales sólidos, previamente calibrada con dos soluciones de pH conocido (4,01 y 7,00). Las medidas se realizaron sobre 10 repeticiones.

Determinación del contenido de humedad

La valoración del contenido de humedad de las bellotas se realizó sobre cuatro lotes de seis bellotas cada uno, desecando en estufa a 75°C hasta peso constante.

Determinación de la densidad de la bellota

Se efectuó mediante la fórmula $d=p/v$, midiendo el peso en balanza analítica y el volumen por medida del líquido desplazado.

Determinación de la cámara de desecación y de índice de flotabilidad

Se determino el volumen de la cámara producida entre el pericarpio del fruto y la semilla, como consecuencia de la retracción de esta, al reducir su contenido hídrico durante el proceso de envejecimiento. La medida se obtuvo por diferencia entre el volumen de la bellota y de la semilla desprovista del pericarpio sobre 10 bellotas. El índice de flotabilidad se valoro por medida directa de las semillas flotantes sobre una submuestra de 30 bellotas y referido a porcentaje.

RESULTADOS Y DISCURSIÓN

En las figuras 1 a 6 se presentan los datos obtenidos con los seis nuevos métodos propuestos para la estimación de la capacidad germinativa. Se han confeccionado seis gráficos donde se compara cada uno de los métodos con la capacidad germinativa obtenida experimentalmente por el método ISTA (1993), que es utilizado como criterio externo. Para cada uno de los métodos se ha establecido el mejor ajuste a una curva por regresión y se ha calculado el coeficiente de correlación para cada uno, así como el nivel de significación. En la tabla 1 se resumen los resultados obtenidos para los tipos de funciones de ajuste encontradas, los modelos matemáticos de ajuste por regresión el coeficiente de correlación y el nivel de significación. Todos los métodos propuesto poseen un coeficiente de correlación superior a 0,78, si bien en unos caso la correlación es negativa y en otros positiva. Los tipo de funciones encontradas como mejor ajuste también son bastante variadas.

Entre las correlaciones positivas destaca el ajuste del contenido de humedad y la capacidad germinativa, que en las condiciones experimentales utilizadas y con una función de ajuste lineal ($y = -108,974 + 4,98446x$) es altamente significativa. con un coeficiente de correlación de 0,98. También muy elevado resultado el ajuste de la respiración aparente, establecida como CO₂ producido por las bellotas en atmósfera confinadas durante 24 horas, con una función tipo parábola sobre el eje X ($y = -46,5356 + 21,399\sqrt{x}$) altamente significativa, con coeficiente de correlación de 0,97. La variación de la densidad de la bellota también puede utilizarse como un método predictivo para estimar la capacidad germinativa; se encontró para ella una función parabólica sobre el eje Y ($y = (-55,7464 + 54,6903x)^2$) áltamente significativa con coeficiente de correlación 0,97.

Entre las correlaciones negativas destaca el coeficiente de correlación muy elevado encontrado para el pH de los cotiledones, con coeficiente de correlación de -0,98 para una función hiperbólica. Es de destacar que en el caso de ajuste a una función lineal la correlación sería positiva, de forma que según se aprecia en la figura 2 cuando aumente el pH también lo hace la capacidad germinativa. El ajuste lineal es muy ligeramente más bajo con un coeficiente de correlación de 0,97 y debido al lo artificioso que resulta la función hiperbólica en este caso puede resultar preferible manejar la lineal ($y = -1031,960 + 206,691x$). Los otros métodos propuestos poseen realmente correlación negativa, en el sentido de que al incrementarse el valor predictivo descende la capacidad germinativa. Presentan en los dos casos, índice de flotabilidad y volumen de la cámara de desecación, correlaciones más bajas que las presentadas hasta ahora. De esta forma el volumen de la cámara de bellota resulta ser más eficaz en la predicción con una función de ajuste tipo parabólica sobre el eje X ($y = 69,4057 - 58,076x^{1/2}$) significativa al 90% con un coeficiente de correlación de -0,81. El índice de flotabilidad para las condiciones experimentales utilizadas es el más bajo de las correlaciones encontradas ($r = -0,78$) pero hay que considerar su extrema simplicidad, se ajusta a una parábola sobre el eje X ($y = 63,1979 - 6,738\sqrt{x}$) con significación del 90%.

Cabe pues considerar que las cinco hipótesis planteadas se cumplen de forma que todos y cada uno de los métodos planteados pueden ser utilizados para la estimación de la capacidad germinativa de semillas envejecidas por desecación, en función de las circunstancias externa relativas a metodología disponible. Especialmente la variación en pH de los cotiledones, la respiración aparente, el contenido de humedad de las bellotas y la densidad.

CONCLUSIONES

1.- Los siguientes métodos rápidos proporcionan una valoración predictiva rápida para estimar la capacidad germinativa en bellotas de alcornoque envejecidas por desecación. a) El contenido de humedad de las bellotas b). Los niveles de respiración aparente de las bellotas. c). El pH de los cotiledones d.) La densidad de las bellotas.

2.- Sería posible hacer una tabla de valoración con el conjunto de los 6 métodos para evaluar la capacidad germinativa, teniendo en cuenta las correlaciones existentes entre las variables.

AGRADECIMIENTOS

El presente trabajo ha sido financiado con los fondos del Proyecto FAIR5-CT97-3480 de la Unión Europea: "Optimization of cork oak seed management in support of Community policies for reforestation and cork production"

A la estudiante de ingeniería agronómica Blanca Niño Ray por su colaboración en la elaboración del resumen en inglés.

BIBLIOGRAFÍA

- BONNER, F.T.; (1990). *Storage of seeds: potential and limitations for germoplasm conservation*. Forest Ecology and Management. 35, 35-43 p.
- HANSON, J.; (1984). *The storage of seeds of tropical tree fruits*. pp 53-62 in Holdn, J.H.W.; Williams, J.T. (Eds) *Crop genetic resources: conservation and evaluation*. London, Allen and Unwin
- ISTA (1993). *International rules for seed testing. Rules* (1993). Seed Science and Technology 21, suplement.
- MERODIO, C & DE LA PLAZA, J.L. (1989). *Interaction between ethylene and carbon dioxide on controlled atmosphere storage of Blanca de Aranjuez pears*. Acta Horticulturae, 258: 81-88
- ROBERTS, E:H.(1973). *Predicting the storage life of seeds*. Seed Science and Technology 1, 499-514.
- SANTOS & BERNARDINI (1995). Influence of moisture content and temperature on storage of *Quercus suber* L seeds. *Silva Lusitanica* 3, 7-16.
- ZULUETA DE, J. & MONTOTO, J.L. (1992). Efectos de la temperatura y la humedad en la germinación de la bellota de encina (*Quercus ilex* L) y el alcornoque (*Quercus suber* L.). *Investigación Agraria, Sistemas y recursos Forestales* 1, 65-71.

| Variable | Tipo de función de ajuste | Modelo de ajuste por regresión | Coefficiente de correlación | Nivel de significación |
|------------------------------|---------------------------|---------------------------------|-----------------------------|------------------------|
| Índice Flotabilidad bellota | Parábola (eje x) | $Y=63.1979 - 6.7388 * \sqrt{X}$ | -0.78 | 90 |
| Contenido en Humedad bellota | Lineal | $Y=-108.974 + 4.98446 * X$ | 0.98 | 99 |
| Volumen Cámara bellota | Parábola (eje x) | $Y=69.4057 - 58.076 * \sqrt{X}$ | -0.81 | 90 |
| pH cotiledones | Lineal | $Y=-1031.96 + 206.691 * X$ | 0.97 | 99 |

| | | | | |
|-------------------------------------|------------------|----------------------------------|------|----|
| Respiración aparente bellota | Parábola (eje x) | $Y = -46.5356 + 21.399 \sqrt{X}$ | 0.97 | 99 |
| Densidad bellota | Parábola (eje y) | $Y = (-55.7464 + 54.6903 * X)^2$ | 0.97 | 99 |

Tabla 1.- Funciones de ajuste entre la capacidad germinativa y las diferentes variables explicativas de la germinación estudiados sobre bellotas envejecidas de *Quercus suber*

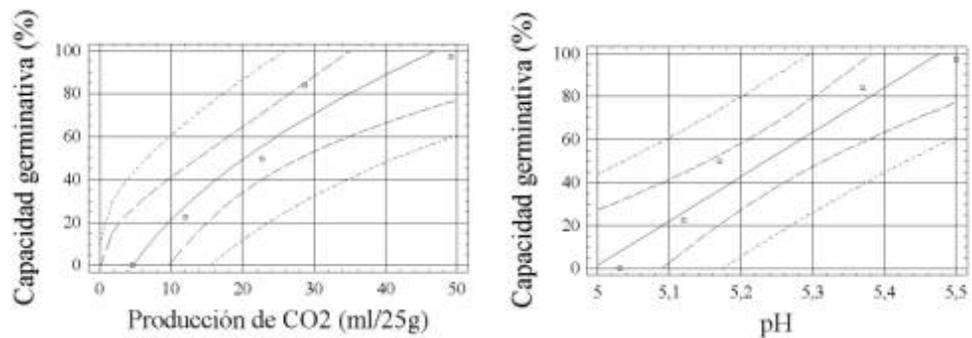
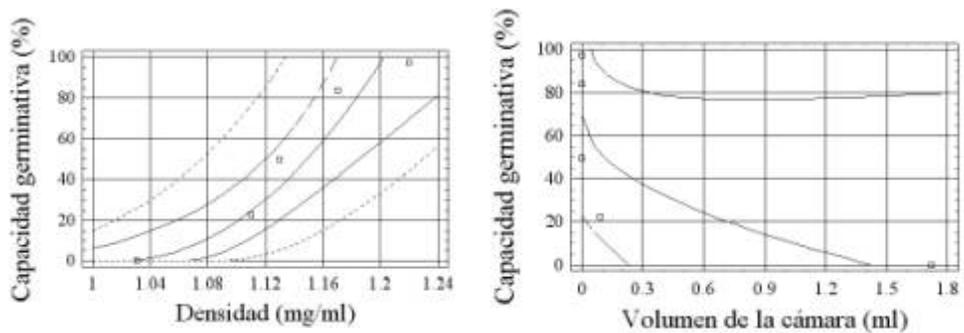


Fig. 1.- Curva de ajuste entre la capacidad germinativa y la producción de CO₂ en bellotas envejecidas de *Quercus suber* (0-3-6-9-12días)

Fig. 2.- Curva de ajuste entre la capacidad germinativa y el pH de los cotiledones de *Quercus suber* (0-3-6-9-12días)



Curva de ajuste entre la capacidad germinativa y la densidad de la bellota de *Quercus suber* (0-3-6-9-12días)

l.- Curva de ajuste entre la capacidad germinativa el volumen de la cámara de desecación en bellotas *Quercus suber* (0-3-6-9-12días)

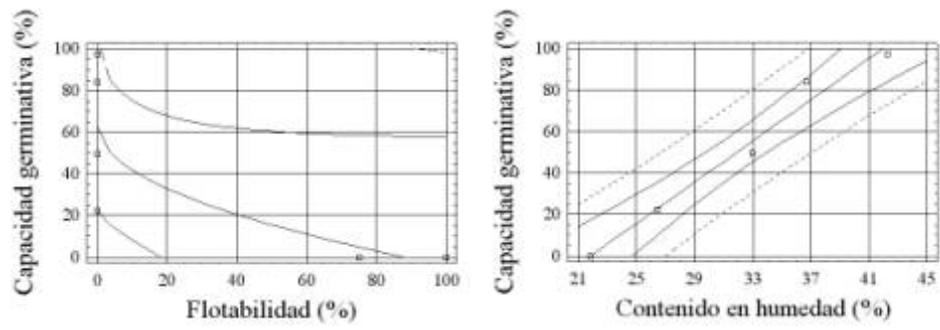


Fig. 5.- Curva de ajuste entre la capacidad germinativa y la flotabilidad de las bellotas de *Quercus suber* (0-3-6-9-12días)

Fig. 6.- Curva de ajuste entre la capacidad germinativa y el contenido en humedad de las bellotas de *Quercus suber* (0-3-6-9-12días)