

PROTOCOLOS DE GERMINACIÓN DE SEMILLAS DE SABINA ALBAR (*JUNIPERUS THURIFERA*) Y SABINA RASTRERA (*J. SABINA*).

J.P. MELERO & P. GARCIA-FAYOS.

Centro de Investigaciones sobre Desertización –CIDE- (CSIC-UV-GV).

RESUMEN

Se estudió la germinación de semillas de *Juniperus thurifera* y *J. sabina*. Ambas especies presentan doble impedimento a la germinación: impermeabilidad y dureza de la testa; y letargo del embrión. En nuestro trabajo, observamos que la escarificación ácida y la estratificación fría (5°C) son soluciones efectivas para la germinación. Además es imprescindible una estratificación fresca (entre 5°-15°C) previa a la estratificación fría y unas condiciones de germinación frescas.

P.C: *Juniperus thurifera*; *J. sabina*; germinación; estratificación fría; estratificación fresca; escarificación.

ABSTRACT

Seed germination of *Juniperus thurifera* and *J. sabina* was studied. Both species show seed coat impermeability and embryo dormancy. In our work, we found that acid scarification and prechilling (5°C) are good treatments for germination. Moreover, cool stratification (between 5°-15°C) before prechilling, and a cool germination environment are needed.

K.W: *Juniperus thurifera*; *J. sabina*; germination; prechilling; cool stratification; scarification.

INTRODUCCION

Dentro del proyecto de investigación “Mejora de la tecnología de obtención, almacenamiento, germinación y uso de semillas de especies silvestres comprendidas en los planes de reforestación y revegetación de la Comunidad Valenciana”, financiado con fondos FEDER, se incluye como objetivos el establecer protocolos de mejora de la tasa y velocidad de germinación de las semillas de 17 especies de gran interés para dichos planes de reforestación. De ellas, 5 especies pertenecen al género *Juniperus*, de las cuales 4 presentan especiales problemas para la germinación. Son los enebros (*J. communis* y *J. oxycedrus*) y las sabinas albar y rastrera (*J. thurifera* y *J. sabina*). En el presente trabajo haremos especial hincapié a las dos últimas.

El aspecto de las semillas de ambas especies difiere principalmente en el tamaño, siendo más grande y heteromorfa la semilla de *J. thurifera* que la de *J. sabina*. Ambas cuentan con un embrión grande y alargado, morfológicamente completo, con dos cotiledones diferenciados. Dicho embrión está rodeado de una capa de endospermo, menos gruesa en el ápice, blanca brillante como el embrión y todo ello está envuelto por una membrana de color marrón que se hace más consistente en la zona del ápice. La testa es de madera muy dura y de considerable grosor, cubierta por una pátina brillante de aspecto grasiento, excepto por el extremo opuesto al ápice, que corresponde con la zona de humectación natural.

En la naturaleza, tanto las semillas de los enebros como las de las sabinas germinan en la segunda y tercera primavera después de la diseminación (Catalán, 1993). La regeneración de los sabinares es lenta y difícil, dado que la germinación es escasa y que el pastoreo excesivo contribuye a la falta de repoblado natural (Ruiz de la Torre, 1979). No son especies que se encuentren habitualmente en viveros forestales y su propagación ha sido para fines prácticamente ornamentales.

Excepto la referencia de Ruiz de la Torre (1979) no hemos encontrado ninguna otra referencia más acerca de problemas y métodos de germinación específicos de las sabinas. En el laboratorio, las semillas del género *Juniperus* presentan dificultades del tipo letargo o dormición (Sebastian, 1958; Ellis et al., 1985; Young et al., 1988; Catalan, 1993; Zine El Abidine et al., 1996). Las causas del letargo hay que buscarlas en la impermeabilidad producida por la pulpa del fruto y por la barrera física que supone la testa y por el letargo del embrión. Los tratamientos habitualmente probados por los investigadores citados han sido la eliminación de la pulpa y los intentos de abrir o permeabilizar la testa mediante escarificaciones ácidas y romper el letargo del embrión mediante estratificaciones frías o alternantes (caliente-fría).

El objetivo que nos planteamos en el presente proyecto es establecer protocolos que aseguren un 75% de germinación en un tiempo inferior a 3 meses y que por su sencillez pueda ser repetible y aplicable en prácticas viverísticas.

MATERIAL Y METODOS

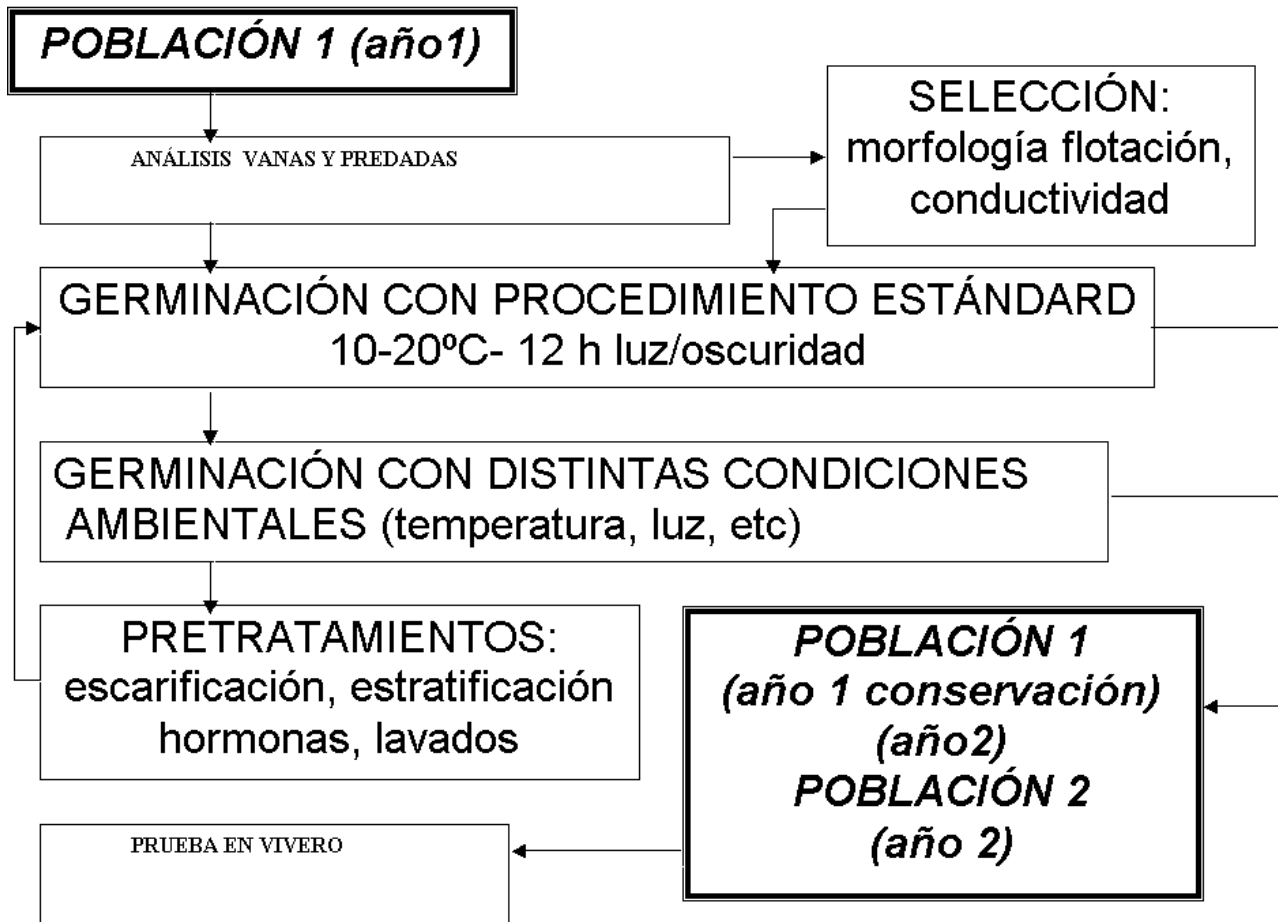
Para las pruebas de germinación, se han utilizado semillas suministradas por el “Banc de Llavors Forestals” (Banco de Semillas Forestales de la Generalitat Valenciana).

El esquema de trabajo seguido para todas las especies incluidas en el proyecto de investigación citado, entre las que se encuentran las especies objeto del presente artículo, se muestra en la Figura 1. Para cada una de las especies se parte de una cosecha de semillas determinada - procedencia y año- sobre la que se trabaja para lograr un protocolo que cumpla el objetivo propuesto. Previo a la germinación analizamos la viabilidad de sus semillas. Si necesitan una selección, aplicamos distintos sistemas de separación de semillas inviables (predadas, abortadas, partenocárpicas). Una vez seleccionadas, se aplica un protocolo de germinación estándar, sin pretratamientos, en cámara de germinación con temperatura y fotoperiodo alternante (10-20°C, 12h-12h). En caso de no obtener el nivel y/o velocidad de germinación propuestos se prueba con otras condiciones de temperatura y fotoperiodo y/o con pretratamientos (escarificación, estratificación, hormonas,...). Una vez alcanzado un protocolo que cumpla las condiciones propuestas se prueba con otros lotes de semillas -de distinta cosecha de la misma procedencia y de otra cosecha de distinta procedencia- para comprobar que dichas condiciones se pueden generalizar. En caso contrario se modifican los protocolos hasta conseguir un único protocolo que sirva para todas las cosechas utilizadas. Una vez alcanzado un protocolo único, éste se pasa a conocimiento de las empresas colaboradoras para la realización de pruebas en vivero y la comprobación de resultados.

Las pruebas de germinación se efectúan sobre cuatro replicas en placa petri con papel de filtro empapado en agua destilada y de 50 semillas cada una. Los parámetros empleados son: Tiempo de latencia -número de días hasta la primera germinación de cada placa-, Tasa de germinación -porcentaje de germinación al final del tiempo estimado o como máximo 3 meses-, y T75% -número de días necesarios para alcanzar el 75% de germinación en cada placa-.

En el caso concreto de los *Juniperus*, pudimos comprobar en ensayos previos la gran cantidad de semillas vanas que hay en los lotes y la gran variabilidad de dicho fenómeno entre los distintos lotes, inclusive entre años distintos de una misma procedencia. Debido a ello se ensayó la separación por flotación a partir de distintas sustancias en base a la mayor o menor facilidad de ajuste de la densidad de flotación y a la minimización de efectos secundarios no deseados. Al final se decidió utilizar diluciones de ácido sulfúrico frente a otras como cloruro sódico porque presentaba mayores rango de ajuste de la densidad, servir como tratamiento de escarificación y no presentar posibles efectos tóxicos. Seguidamente, y dado que los protocolos estándar sin pretratamientos se adivinaban inútiles dado la bibliografía previa (Ellis et al., 1985; Catalán, 1993), se ensayaron escarificaciones y estratificaciones. Para la

Figura 1



escarificación se utilizó ácido sulfúrico concentrado, aplicado a las semillas (mejor que a frutos deshidratados), durante distintos tiempos de aplicación. El volumen de ácido utilizado fue aproximadamente el doble del volumen de las semillas y se mantuvo en agitación por medio de un agitador de brazo oscilante, durante el tiempo estimado de escarificación. Para la estratificación se empleó arena de sílice de pequeña granulometría y bandejas de plástico de 20x10x3cm.. El procedimiento consiste en poner una primera capa de arena de un volumen aproximado de 100ml. Sobre esta capa se distribuyen las semillas y se tapan con una nueva capa igual a la primera. Las bandejas ya completadas se pesan y se anota su peso en seco. Seguidamente se colmata el sustrato con agua destilada durante un tiempo y se procede al escurrido del agua en exceso. Nuevamente se pesa y se anota el peso (en saturación). El control de la humedad de las bandejas se efectúa mediante pesada.

Las semillas así tratadas se pasan a germinar en las condiciones estándar y en condiciones diferentes de temperatura. Se realizaron distintos ensayos en los que se varió el tiempo de estratificación y las temperaturas de germinación.

RESULTADOS Y DISCUSION

Las pruebas realizadas con semillas seleccionadas, escarificadas y puestas a estratificar a 5°C durante 1, 2, 3 o 4 meses no dieron los resultados deseados en ninguna de las dos especies.

Los problemas detectados en la germinación nos confirmaron la existencia de un letargo físico junto con otro innato ya descrito por otros autores (Sebastian, 1958; Ellis et al., 1985; Young 1988 y 1992 Zine El Abidine 1996). El primero de ellos producido por la testa y que ha resultado imposible de eliminar total y uniformemente mediante la escarificación ácida, aunque dieron resultados mas positivos para el caso del *J. sabina*, posiblemente a la mayor homogeneidad de tamaños de las semillas que su congénere. El letargo interno, posiblemente producido durante la maduración de los gábulos, no se ha podido vencer con la estratificación fría de 3-4 meses recomendada (Young, 1988; Catalán, 1993). Por otro lado, al transferir las semillas así tratadas a las condiciones estándar (10-20°C), se producen germinaciones en un tiempo muy corto, pero se detienen enseguida alcanzando muy bajas tasas, esto nos hace pensar que estas condiciones no son adecuadas y que pueden estar induciendo nuevos letargos en las semillas.

Para superar estos problemas primero incrementamos el tiempo de las escarificaciones ácidas hasta superar una hora en condiciones de agitación continua. Pudimos comprobar que una escarificación ácida excesiva produce la rotura de la testa por el extremo opuesto al de aparición del ápice. Estas semillas, aunque siguen siendo viables, tienen tendencia a emitir los cotiledones antes que la raíz y no dan lugar a plantulas viables (Pardos & Lazaro 1983).

Respecto a las estratificaciones, llegamos a la conclusión de que aunque el pretratamiento de frío ($T \leq 5^\circ\text{C}$) es imprescindible para la germinación (Ellis 1985), quizá hiciera falta un periodo de estratificación fresca anterior a la fría para conseguir abrir la testa y por tanto mejorar la capacidad de humectación. Sin embargo, las estratificaciones clásicas (20-25°C) produjeron resultados confusos, como pérdidas de endospermo, fuertes contaminaciones y posibles letargos inducidos (Pack 1921). Pasamos entonces a estratificar en temperaturas inferiores a 20°C e incorporamos saltos térmicos como posibles mejorantes de las condiciones.

Respecto a la transferencia de las semillas germinadas a condiciones exteriores (invernadero), se comprobó que continúan su desarrollo sin aparente dificultad. Sólo en algunos casos se comprobó la falta de crecimiento de la radícula y su inviabilidad. puede crear dificultades para el completo desarrollo de la plántula (Johnsen & Alexander, 1974)

A partir de estos ensayos se propuso el siguiente protocolo para *Juniperus sabina*:

- 1.- Selección por flotación en ácido sulfúrico diluido.
- 2.- Escarificación ácida con ácido sulfúrico concentrado (95-97%) y eliminación de la costra quemada y las semillas flotantes. Tiempo aproximado 30 minutos.
- 3.- Primera estratificación a 5-15°C 12h-12h en tiempo variable hasta 2 meses.
- 4.- Segunda estratificación a 5°C hasta 4 meses.
- 5.- Germinación en condiciones 4-10°C oscuridad.

Los mejores resultados se han alcanzado con dos meses de estratificación a 5-15°C y dos meses de estratificación a 5°C (50% de germinación en tres meses).

En el caso de *Juniperus thurifera* se han detectado de una forma más aguda los numerosos problemas ya mencionados como inviabilidad y complicado proceso de selección de semillas viables, impermeabilidad y dureza de la testa, contaminación en el lento proceso de germinación y fuerte letargo interno, lo que ha hecho inviable hasta el momento de obtener un buen protocolo de germinación. Dado que durante los tratamientos y pruebas apreciamos que las semillas que culminaban la germinación eran sólo las que previamente habían abierto la testa, los esfuerzos actuales se están dirigiendo a encontrar pretratamientos que maximicen la apertura de las semillas. Una vez se logra abrir las semillas la germinación se consigue fácilmente con el siguiente protocolo:

- 1.- Una estratificación fría a 5°C 1 a 2 meses.
 - 2.- Germinación en condiciones 5-15 12h-12h (luz/oscuridad)
- De esta manera la germinación se completa en dos meses con una tasa superior al 70%.

Trabajando con condiciones de germinación de 4-10°C se alcanzan tasas similares pero necesitan más tiempo, mientras que condiciones de germinación a 10-20°C producen germinaciones explosivas (en muy poco tiempo) pero con una tasa muy baja.

CONCLUSIONES

Ambas especies presentan un doble impedimento a la germinación, por un lado la impermeabilidad y dureza de la testa y por otro el letargo del embrión. La escarificación ácida puede reducir y mejorar el estado inicial pero su efecto no es homogéneo lo que nos hace pensar en distintos estados de la testa (grosor, dureza, impermeabilidad).

Una primera estratificación fresca es necesaria. El procedimiento se encuentra en fase de estudio. Pensamos que es esta estratificación la que tiene que romper la impermeabilidad de la testa y dejar al mayor número de semillas en condiciones de salir activadas por la estratificación fría (eliminación del letargo interno) para alcanzar una buena tasa de germinación de estas especies.

La estratificación fría, común para estas especies en todas las técnicas de germinación, es imprescindible, pero parece que no es necesario superar los 2 meses.

La fase de germinación nos ha dado mejores resultados en condiciones frescas (5-15°C) o 4-10°C que en templadas 10-20°C

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- Catalan, G. 1993 Semillas de árboles y arbustos forestales. ICONA. Madrid.
- Ellis, R.H., Hong T.D. and Roberts E.H. 1985. Handbook of seed technology for genebanks. I.B.P.G.R. Rome 1985.
- Pack, D.A. 1921. After-ripening and germination of *Juniperus* seeds. Bot. Gaz. 71: 32-60.
- Pardos, J.A. & Lazaro, G. 1982. Aspectos de la germinación del *Juniperus oxycedrus* L. An. INIA. Serie Forestal 7: 155-163.
- Ruiz de la Torre, J. 1979. Árboles y arbustos de la España Peninsular. E.T.S. de Ing. de Montes. Madrid.
- Sebastian, C. 1958. Essais de germination de quatre espèces du genre *Juniperus*. Bul. Soc. Sci. Nat. Phys. Maroc. 38: 115-121.
- Young, J. A., Evans, R.A., Budy, J.D. and Palmquist, D.E. 1988. Stratification of seeds of Western and Utah Juniper. Forest Sci. 34: 1059-1066.
- Young, J. A. & Young, C.G. 1992. Seed of woody plants in North America. Dioscorides Press. Portland.
- Zine El Abidine, A., Zaidi, A. & Niass, M. 1996. La germinación des graines du genévrier rouge (*Juniperus phoenicea*). Ann. Rech. For. Maroc. 29: 1-23.

