

ESTUDIO SOBRE LA CONSERVACIÓN DE SEMILLAS RECALCITRANTES DE *Quercus ilex* L. y *Quercus suber* L.

J. ZAZO MUNCHARAZ¹; C. CALDERÓN GUERRERO^{1*}; J.M. MARCOTE JUSTE

¹Escuela Universitaria de Ingeniería Técnica Forestal. Dpto.Silvopascicultura. Universidad Politécnica de Madrid. Avd/Ramiro de Maeztu s/n. 28040 Madrid. *e-mail: carlos.calderon@upm.es

RESUMEN:

Se ha estudiado la posibilidad de almacenar y conservar semillas recalitrantes de *Quercus ilex* L. y *Quercus suber* L. durante periodos de tiempo superiores a los ensayados hasta la fecha, empleado un sistema de conservación en frío y húmedo, mediante bolsas de polietileno con la ventaja de la disminución considerable del volumen de almacenamiento. Para ello, se han realizado los prescritos análisis de germinación, según las normas ISTA, para comprobar que la potencia y la capacidad germinativa de las semillas no se ve mermada en exceso tras dicho periodo de almacenamiento. Los resultados obtenidos han sido satisfactorios en el caso de las bellotas de encina, superándose los cuatro años. No así en el caso de las bellotas de alcornoque en las que se inducía un desarrollo radical normal, mientras que se producía una inhibición del crecimiento del epicotilo.

P.C. Viveros, germinación, bellotas, alcornoque, encina.

ABSTRACT:

We studied the possibility to keep and store recalcitrant seeds from holm oak and cork oak for periods longer than usual methods. We tried a cool and high moisture storage system in polytene bags with the advantage of a decreasing of the storage volume. So that, we made the germination tests, according to the ISTA rules, to make sure that this capability will be not affected for long time storage. Results for these analyses have been satisfactory successful for *Quercus ilex* L. storage for more than 4 years time. Not the same, for cork oak acorns, where the hypocotyl developed fairly well, but there was an inhibition for the epicotyl growing.

K.W. Nursery, germination, acorns, cork oak, holm oak.

INTRODUCCIÓN:

Las semillas recalitrantes son muy sensibles a la desecación y pierden su viabilidad si su contenido de humedad disminuye por debajo de un valor relativamente bajo de ésta. Por ello el almacenamiento convencional de estas semillas sin pérdida de viabilidad (normalmente estratificación), sólo puede garantizarse para cortos periodos de tiempo. Los escasos estudios de conservación de semillas del género *Quercus* del área mediterránea establecen que para que las semillas mantengan su viabilidad deben conservarse en ambiente húmedo (CATALAN, G.; 1988; VAZQUEZ, F.; 1998; BONNER, F.T. & VOZZO, J.A.; 1987; RUPEREZ, A.; 1957) y con aporte de oxígeno debido a su respiración activa (WANG, B.; 1993; GORDON, A.G.; 1982)

Los factores principales que afectan al tratamiento son:

Humedad: La humedad de las semillas del género *Quercus* es el factor limitante del almacenaje por excelencia. Una humedad relativa baja de conservación afecta a la viabilidad, descendiendo de una forma brusca a partir de unos porcentajes determinados y si ésta supera ciertos valores críticos, las semillas mueren (ZULUETA, J y MONTOTO, J.L.; 1992). Por ello, la humedad ambiente de conservación debe ser elevada, lo suficiente para que la humedad de las semillas se mantenga en unos niveles parecidos al momento de maduración en el árbol.

Temperatura: En general, las semillas de especies del género *Quercus*, se conservan bien a baja temperatura, pero teniendo en cuenta que cuando éstas bajan de cero, pueden ocasionar daños por congelación con pérdida de la capacidad germinativa e incluso la muerte (HOLMES, G.D. & BUSZZEWICZ, G.; 1958), (PÉREZ, A.; 2002). De esta manera, se comprueba que no sufren daños si se mantienen a -5°C durante 25 o 30 días (con la cubierta sin rajar), a -10°C mantienen su viabilidad, sólo por unos días, aproximadamente un 50% de las bellotas y resulta letal la temperatura de -15°C para todas ellas (ZAZO, J. et al.; 2000). La tasa de respiración de las semillas disminuye con las bajas temperaturas en relación con la temperatura ambiente sin llegar a anularse, por lo que las semillas mantienen su actividad metabólica. La temperatura influye en la absorción de humedad durante el almacenamiento. Según (HOLMES, G.D. & BUSZZEWICZ, G.; 1958), altas temperaturas conllevan niveles de contenido de humedad de semillas más bajos.

Aireación: Las semillas del género *Quercus* necesitan cierto intercambio de aire durante el almacenamiento para evitar que la actividad respiratoria no se anule. No es recomendable guardar la semilla en recipientes herméticos (WANG, 1993), ya que la concentración de CO_2 aumentaría y a partir de unos valores críticos de ésta, se originan efectos tóxicos por respiración anaerobia y se recalienta la semilla. En cambio, una mayor concentración de oxígeno hace que permanezcan viables durante más tiempo (VAZQUEZ, P.; 1988). De manera similar, un aumento de aireación evita la concentración de CO_2 .

Luminación: No se recomienda que exista iluminación durante el almacenaje (FINCH-SAVAGE, W. E.; 1992). Pese a que hay pocos estudios concluyentes al respecto, la conservación en contenedores transparentes ha dado peores resultados que en medios opacos.

El objetivo de este estudio se centra en conocer cual es la respuesta de las semillas de dos especies típicamente mediterráneas: *Quercus ilex* L. (encina) y *Quercus suber* L. (alcornoque), durante el almacenamiento para su conservación por un periodo de tiempo relativamente largo en comparación con las experiencias que se han realizado con anterioridad y las exigencias que presentan este tipo de semillas recalitrantes. (ZAZO, J. et al.; 2000).

MATERIAL Y MÉTODOS:

El ensayo se desarrolló desde finales de Noviembre del año 1998 hasta el mes de mayo del 2003. Las semillas utilizadas en el estudio procedían de encinas y alcornoques del término municipal de Alburquerque (BADAJOZ), siendo la región de procedencia la número 11b-Sierra de San Pedro. Las bellotas de encina fueron recolectadas mediante vareo y recogidas del suelo con lonas la primera quincena de octubre de 1998 y las de alcornoque un mes más tarde. Las semillas se envasaron inicialmente en sacos de plástico para evitar pérdidas de humedad. Posteriormente, se almacenaron temporalmente hasta el inicio de los ensayos en cámara bien ventilada y a baja temperatura metidas en sacos de arpiller, a su vez envueltos en sacos de polietileno de 300 de galga. Durante el desarrollo del ensayo, las semillas siguieron almacenadas en frío con unas condiciones de temperatura en torno a los $0-2^{\circ}\text{C}$ y una humedad relativa del aire próxima al 85 %, manteniéndose dichas condiciones, así como la humedad de las semillas en torno al 45%, a lo largo del tiempo.

El procedimiento seguido consistió en tomar una muestra aleatoria de un número indeterminado de bellotas, sobre el que se realizó una prueba para determinar cual era el índice de mortalidad, para a continuación establecer las siguientes categorías: 1) *Quercus suber* L. vivas y pregerminadas. 2) *Quercus ilex* L. vivas y sin germinar. 3) *Quercus ilex* L. vivas y pregerminadas

En todas las analíticas se siguieron los métodos científicos y estadísticos que recomienda la Asociación Internacional de Ensayos de Semillas (ISTA, 1999). Tan solo en el caso de la analítica de germinación, se decidió separarnos de esa normativa por considerar que el pretratamiento de inmersión en agua recomendado por la ISTA, no era necesario por tratarse de semillas de tipo recalitrante, del mismo modo tampoco se seccionó la zona de la cúpula, y la duración del ensayo se prolongó hasta los 61 días en lugar de 28 como recomienda el organismo internacional, justificando dicha decisión con el hecho de que la observación de las curvas de germinación expresa que un importante número de semillas germinan más allá del trigésimo día de ensayo.

Las características de las semillas pasados 3 años de almacenaje fueron:

2.1.- Analítica de peso de las semillas: El día 7 de diciembre de 2001, se realizó una analítica de peso a todos los lotes y categorías de semillas, siguiendo las normas ISTA. Se realizaron cuatro pesadas de un submúltiplo de 100 semillas, para luego poder extrapolar dichos resultados a una pesada de 100, se calculó la media aritmética de estas extrapolaciones y se calculo la tolerancia del análisis según las normas ISTA. El procedimiento fue simplemente proceder a la reunión aleatoria del número de semillas necesarias, depositarlas sobre una cubeta previamente situada sobre la báscula y proceder al pesado, esas semillas se apartaron del resto para no incluirlas en las siguientes pesadas y repetimos dicha operación un total de cuatro veces para cada categoría. Las fórmulas utilizadas fueron:

- $T = \text{Tolerancia del ensayo}$
- $P_{100} = (P_1 + P_2 + P_3 + P_4) / 4$
- $DIF = \text{Diferencia entre pesadas extremas } (P_{MAX} - P_{min})$
- Si $T > DIF$, el análisis es válido, si $T < DIF$ la analítica no es válida.
- $P_{1000} = P_{100} * 10$
- $N_{1000} = (10^6 / P_{1000})$

2.2.- Analítica de contenido de humedad en porcentaje de peso: El día 18 de Diciembre de 2001 se empezó a llevar a cabo un análisis del contenido de humedad de las semillas almacenadas, para cada uno de los lotes y tipos que se han distinguido en el ensayo de germinación. El proceso operativo fue sencillo, se realizaron cuatro pesadas de varias semillas, en función de cada lote, el número varió de cuatro pesadas de 3 semillas para el lote más pequeño hasta cuatro pesadas de 5 semillas para los lotes mayores. Por otro lado las fórmulas matemáticas empleadas para terminar este análisis fueron las que se exponen a continuación:

- $DIF_i = (\text{PESADA INICIAL}_i) - (\text{PESADA TRAS SECADO}_i)$
- $HUM_i(\%) = (DIF_i / 1^{\text{a}} \text{ PESADA}_i) \cdot 100$
- $HUM_{media} = (H_1 + H_2 + H_3 + H_4) / 4$

2.3.- Análisis de germinación: En el mes de diciembre de 2001, es decir, 3 años después de recoger las bellotas, se procedió a realizar la siembra de un grupo de 100 semillas de cada especie, en un sustrato compuesto por turba esterilizada y perlita en una proporción de 75 % de turba y 25 % de perlita. Los envases utilizados para realizar la siembra fueron del tipo Forest Pot 300. A efectos de este estudio se consideró que las semillas habían germinado, una vez que desarrollaban correctamente el epicotilo, por ende, los resultados que se obtuvieron fueron mucho más prematuros en *Quercus ilex* L., mientras que en el caso de *Quercus suber* L. se retrasó mucho la consideración de algunas semillas como germinadas, ya que, a pesar de que se podían observar raíces perfectamente desarrolladas, dichas plántulas no se consideraron germinadas. A este respecto cabe destacar, que en todas las analíticas realizadas, decidimos seguir las instrucciones de la ISTA para semillas del género *Quercus*, sin embargo, en cuanto al análisis de germinación se refiere, nos separamos de estas normas, para llevar el conteo de germinación hasta el día 61, con primer día de conteo a la semana de iniciado el ensayo y contando cada dos días, del mismo modo, las semillas no fueron pretratadas en agua, ni se seccionó la zona de la cúpula como recomienda la ISTA, sino que fueron puestas a germinar directamente desde la conservación y en sustrato en lugar de en cámara de germinación. Dicha decisión, creemos queda suficientemente justificada, a vista de los resultados y de las curvas de germinación, que como se puede observar tienen un importante incremento, más allá del día 30 de ensayo, ajenas de que el desarrollo del ensayo en nuestro caso, buscaba como fin la producción de plántulas en perfecto estado y con plena capacidad de arraigo y desarrollo, y no sólo la germinación que por sí misma no es garantía de éxito en la producción de planta.

Con el fin de aleatorizar al máximo el ensayo se decidió utilizar un total de 10 bandejas de Forest-Pot 300, con un total de 500 envases y 50 envases por bandeja. Cada una de dichas bandejas se dividió longitudinalmente en dos secciones de 25 envases, y en cada una de estas secciones se procedió a sembrar una semilla por envase de una de las categorías de semilla establecidas, de manera que cada grupo de 100 semillas que correspondían con cada categoría se subdividieron en 4 lotes de 25 semillas, cuyo conteo se realizó de manera común. Las 10 bandejas se distribuyeron en la superficie del invernadero, en el que la temperatura ambiente está controlada en torno a los 25° C, la humedad relativa del aire próxima a la saturación y con un total de dos riegos efectuados por aspersión diariamente, uno por la mañana y otro por la tarde.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN:

3.1.- Resultados sobre supervivencia de semillas: Los resultados de la analítica se presentan en el **gráfico I**. Destacamos la única matización entre bellotas vivas pregerminadas y sin germinar, que aparece en la parte correspondiente a bellotas de *Quercus ilex* L., este hecho obedece a que como ya se ha reseñado en epígrafes anteriores sólo en este tipo de semillas se pudieron establecer esas dos categorías, ya que en las semillas de alcornoque, todas las semillas que se encontraron vivas se hallaban pregerminadas. A la vista de estos resultados se evidencia que, al menos a primera vista, el índice de supervivencia de las semillas de alcornoque es superior al de las semillas de encina, y que por lo tanto, las semillas de *Quercus suber* L. pueden ser almacenadas durante periodos más largos que las de su congénere, sin embargo como se comprobó posteriormente, las semillas de alcornoque ven afectada de un modo muy severo su capacidad germinativa, hecho que convierte en poco recomendables largos periodos de almacenaje en las semillas de esta especie.

3.2.- Resultados sobre la analítica de peso de las semillas: Los resultados que ofreció dicho análisis se exponen en la **tabla I**. Resultando válido para todas las submuestras. Por otro lado, el tamaño de las semillas de todas las categorías se contrastó con los datos obtenidos por (NAVARRO, R y GÁLVEZ, C; 2001), los cuales daban como valores estándar para la encina desde 15 x 8 mm, hasta 35 x 18 mm, mientras que para el alcornoque los tamaños oscilaban de 20 x 10 mm a 45 x 18 mm, con ello se pretende comparar el tamaño de las semillas empleadas, con datos de reciente actualización, ya que se ha comprobado el hecho de que la capacidad germinativa de las bellotas está íntimamente relacionada con su tamaño. (PARDOS, M; CAÑELLAS, I y BACHILLER, A; 1997) Así pues el tamaño de las semillas empleadas en el ensayo se contrastó de manera estadística con una muestra de 25 semillas para cada uno de los lotes y grupos, arrojando los resultados expuestos en la **tabla II**, que demuestran que las semillas empleadas eran de gran tamaño.

3.3.- Resultados sobre la analítica de contenido de humedad en porcentaje de peso: Se adjunta también la **gráfica II** en la que se puede comprobar que el contenido de humedad de las semillas después de tres años de almacenamiento no había sufrido grandes pérdidas con respecto a los valores de humedad que tenían en el momento de la recolección, así mismo en dicha gráfica se comprueba que a pesar de la larga duración del periodo de almacenaje, la humedad de todas las categorías y lotes de semillas oscilaba entre un 35% y un 50%, valores que se encuentran dentro del rango admisible para semillas recalcitrantes. Se calculó el contenido de humedad a las 48 hrs y a las 72 y se comprobó que prácticamente no variaban, por lo que se decidió tomar como valores adecuados los correspondientes al secado tras 48 horas.

3.4.- Análisis de germinación: Los **gráficos III y IV** muestran cual ha sido la potencia germinativa hasta el día 61, en que concluyó el estudio. El resumen del ensayo de germinación se expresa a continuación:

- <i>Quercus suber</i> L.	Capacidad germinativa = 7%
- <i>Quercus ilex</i> L. pregerminadas	Capacidad germinativa = 43%
- <i>Quercus ilex</i> L. sin germinar	Capacidad germinativa = 63%

CONCLUSIONES:

a) La conservación de semillas del género *Quercus* más allá de un periodo de dos años es viable. Tanto para *Quercus ilex* L., como para *Quercus suber* L. es perfectamente factible almacenar las bellotas por un largo periodo de tiempo, en condiciones de humedad elevada (85%) y temperatura baja entre 0° y 2°C. (cuanto más se aleje de ésta, menor viabilidad), en bolsas de polietileno oscuras y de alta galga. Tienen la ventaja de que por su sencillez de manejo, ocupan menos espacio, y son menos sensibles a los cambios de humedad-temperatura producidos en las cámaras.

b) La humedad se logra mantener en este periodo e incluso aumentar, y la germinación es buena y se mantiene a lo largo del tiempo. Es preferible hacer este ensayo sobre turba que sobre arena, pero teniendo precaución de realizar tratamiento fúngico por manifestación de hongos en este sustrato. Queda probado que al no descender la humedad durante el almacenamiento, las semillas no merman su viabilidad y la conservan a niveles significativamente altos durante este periodo de conservación.

c) No es necesario proceder a la estratificación de las semillas en ningún tipo de sustrato, con las ventajas que ello representa en cuanto al volumen de almacenaje.

d) Un recipiente apropiado para proceder al almacenaje de las semillas, son las bolsas oscuras de polietileno de alto espesor (galga) que reduce sensiblemente el intercambio de humedad de las semillas con la atmósfera del local de almacenamiento.

e) Las semillas de encina (*Quercus ilex* L.) soportan los cuatro años de almacenamiento en las condiciones mencionadas, obteniendo al final unos valores de mortalidad bastante bajos, y con valores de potencia germinativa próximos al 50 %.

f) Por otro lado las semillas de alcornoque (*Quercus suber* L.) no pueden ser sometidas, en las condiciones indicadas, a periodos de almacenamiento tan largos, ya que los valores de potencia germinativa que resultan al final son casi nulos, en torno al 5%, detectándose una inhibición del desarrollo del epicotilo, probablemente de naturaleza fisiológica, debido al largo periodo de almacenamiento.

g) Las semillas sometidas al almacenaje, sufrieron en su mayor parte un proceso de pregerminación, lo cual no supuso un problema para el posterior desarrollo de la plántula.

BIBLIOGRAFÍA:

- BONNER F.T. & VOZZO, J.A.; 1987. *Seed biology and technology of Quercus*. U.S.D.A. Forest Service. Informe técnico general S.O-66 de la Southern Forest Experiment Station, New Orleans, Louisiana. Informe recogido a través de <<http://www.usda.gov>>.
- CATALÁN BACHILLER, G.; 1988. *Semillas de árboles y arbustos*. Monografía 17 del ICONA. Ministerio de Agricultura. Madrid.
- CARRASCO, DOMÍNGUEZ, HERRERO, NICOLÁS; 1995. "El tamaño de la bellota influye en el éxito de las plantaciones de encinas y quejigos". Revista Quercus, nº117, Madrid.
- FAO. "La manipulación de semillas forestales". Cuaderno nº4 del Manual Universal de Plantación de Bosques. Roma.
- FINCH-SAVAGE, W. E.; 1992. Seed development in the recalcitrant species *Quercus robur* L. Germinability and desiccation tolerance. *Seed Science Research*, 2, 17-22.
- GORDON, A.G.; 1986. *Seed Manual for Forest Trees*, bulletin 83. Forestry Commission.
- HOLMES, G.D. & BUSZZEWICZ, G; 1958. *The Storage of seed of temperate forest tree species*. Forestry Abstracts 19.
- ISTA; 1999. Rules. Proceedings of the International Seed Testing Association. Seed Science and Technology.
- MAGINI, E. (1962). *Forest Seed handling, equipment and procedures*. Unasylva, Vol. 16, FAO, Roma.
- NAVARRO, R; GÁLVEZ, C.; 2001. Manual para la identificación y reproducción de semillas de especies vegetales autóctonas de Andalucía / [coordinadores, Juan Carlos Costa Pérez, Antonio Sánchez Lanchar]. Andalucía : Consejería de Medio Ambiente.
- OÑORO NAVARRO, I., 1996. "Estudio sobre la conservación de las semillas de *Quercus suber* y *Quercus pyrenaica*, síntesis y puesta a punto de la analítica de estas semillas". E.U.I.T. Forestal.
- PARDOS, M; CAÑELLAS, I y BACHILLER, A; 1997; Influencia del tamaño de bellota y del régimen de riego en la calidad de planta de alcornoque cultivada en vivero. II Congreso Forestal Español. Tomo III, pag. 189. Pamplona.

- PÉREZ, A; 2002; Estudio sobre los efectos de la congelación en semillas de *Quercus ilex* L. y su evaluación mediante diferentes test de viabilidad. EUIT Forestal. Madrid.
- RUPEREZ, A; 1957. La Encina y sus tratamientos. Madrid.
- RODRÍGUEZ RUIZ, M. (1996). Estudio sobre la conservación de las semillas de *Quercus ilex* y *Quercus faginea*, síntesis y puesta a punto de la analítica de estas semillas. E.U.I.T Forestal.
- VÁZQUEZ PARDO, F.; 1998. "Semillas del género Quercus. Biología, Ecología y Manejo", *Junta de Extremadura*.
- WANG; B. S. P.; 1993; Ex situ storage of seeds, pollen and in vitro cultures of perennial woody plant species. FAO.
- WILLIAM, R.L. (1956). Guía para la Manipulación de semillas forestales, *Estudio FAO 202*.
- YUSTE, J.A.; 1999. Estudio de la influencia de los distintos medios en la conservación de semillas recalcitrantes de especies del género Quercus. Aplicación a *Q. suber* y *Q. pyrenaica*. E.U.I.T. Forestal. Madrid.
- ZAZO, F.J.; CALDERÓN, C; CORNEJO, L.; 2000. Caracteres culturales y otras características de interés de las frondosas forestales españolas. E.U.I.T. Forestal. Madrid.
- ZULUETA, J; MONTOTO, J.L.; 1992. Efecto de la temperatura y la humedad en la germinación de bellotas de encina y alcornoque. Instituto de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria. Madrid. Investigación Agraria: Sistemas y Recursos Forestales, Vol. 1, nº1, pags:65-71.

GRÁFICO I: (PORCENTAJES DE SUPERVIVENCIA DE LAS SEMILLAS. (después de 3 años))

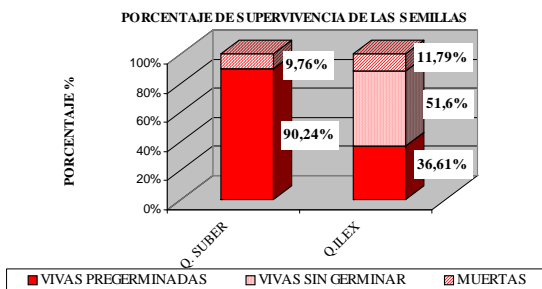


TABLA I: RESULTADOS DE LA ANALÍTICA DE PESO. (después de 3 años)

LOTE	1ª pesada	2ª pesada	3ª pesada	4ª pesada	MEDIA	TOLERANCIA	VALIDEZ
<i>Q. suber</i>	676,42 g	661,84 g	659,3 g	658,7 g	664,065 g	T= 39,84 g	VALIDO
<i>Q. ilex</i> sin germinar	505 g	488,88 g	492,84 g	483,68 g	492,6 g	T= 29,56 g	VALIDO
<i>Q. ilex</i> germinada	564,24 g	582,4 g	578,92 g	566,6 g	573,04 g	T= 34,38 g	VALIDO

TABLA II: RESUMEN DE RESULTADOS DE P_{1000} Y N_{1000} PARA LOS DISTINTOS TIPOS DE SEMILLAS Y TAMAÑO DE LAS SEMILLAS EMPLEADAS EN EL ENSAYO.

	<i>Q. suber</i>		<i>Q. ilex pregerminadas</i>		<i>Q. ilex sin germinar</i>	
	Diám.	Long.	Diám.	Long.	Diám.	Long.
P_{1000}	6640,6 gr.		4926,0 gr.		5730,4 gr.	
N_{1000}	151 sem.		203 sem.		175 sem.	
Tamaño	Diám.	Long.	Diám.	Long.	Diám.	Long.
MEDIA mm.	17,68	36,66	16,92	37,38	15,94	35,34

GRÁFICO II: PORCENTAJES DE HUMEDAD DE CADA UNA DE LAS CATEGORÍAS

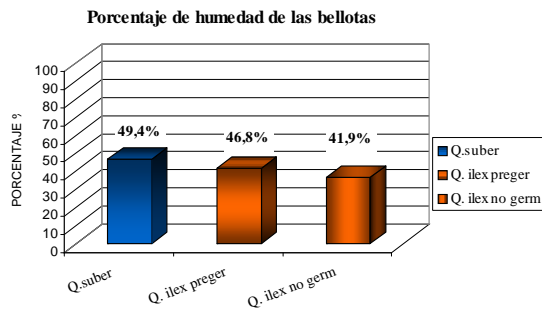


GRÁFICO III y IV: VALORES DE GERMINACIÓN DE CADA CATEGORÍA

