

INFLUENCIA DEL CONTENIDO DE HUMEDAD Y DEL TIEMPO DE ALMACENAJE SOBRE LA CAPACIDAD GERMINATIVA EN BELLOTAS DE ENCINA (*QUERCUS ILEX* SUBSP. *BALLOTA* L.) SOMETIDAS A CONGELACIÓN. RESULTADOS PRELIMINARES.

M.J. AROCA^{1*}; SERRADA R.¹; C. CALDERÓN GUERRERO¹

¹Departamento de Silvopascicultura. EUIT Forestal. Universidad Politécnica de Madrid. Ciudad Universitaria, s.n. 28040. Madrid.

^{1*} aroca@forestales.upm.es ; ¹ serrada@forestales.upm.es ;

* Autor para correspondencia.

Resumen: La irregularidad interanual en la producción de fruto en las masas de especies del género *Quercus* justifica la necesidad de encontrar las condiciones óptimas de almacenamiento de estas semillas, es decir aquellas que minimizan las pérdidas de viabilidad con el paso del tiempo.

En el presente trabajo se analiza la influencia del tiempo y la humedad sobre la conservación de la capacidad germinativa de bellotas de encina sometidas a un proceso de almacenamiento a una temperatura de -4°C.

Se plantea un diseño factorial con dos factores, humedad y tiempo. Dentro del factor humedad se consideran cinco niveles: humedad ambiente (testigo), saturación (inmersión en agua durante 48 horas), y tres niveles intermedios obtenidos mediante tres tiempos de secado a 40°C: 7, 15 y 30 horas. Para el factor tiempo, se evalúan seis niveles correspondientes a 0, 2, 4, 8, 14 y 22 meses de permanencia en las condiciones de conservación.

Los resultados preliminares presentados en la presente comunicación corresponden a los cinco primeros tiempos de ensayo.

Palabras Clave: germinación, semillas, encina, almacenamiento.

INTRODUCCIÓN

La germinación de una semilla sana fuera del estado de latencia depende esencialmente de tres factores: humedad, temperatura y posibilidad de intercambio gaseoso.

El comportamiento de la semilla durante la germinación en relación con estos factores puede estudiarse de acuerdo con la teoría de la ley de la tolerancia (CARDILLO, 2001 y SHELFORD, 1913 en CARDILLO, 2001): *1. La semilla sometida a ciertos valores mínimos de un factor muere o pierde su viabilidad. 2. Si se incrementan estos valores la semilla no pierde capacidad germinativa pero tampoco germina. 3. Existe un rango en el cual se consigue germinación y un punto óptimo donde ésta es máxima. 4. Si el incremento prosigue se llega a una zona de no germinación con vida latente para alcanzar al final un punto en el que se produce la muerte del embrión.*

Los procesos de almacenamiento de semillas, constituyen un ejemplo del segundo caso: se busca ralentizar al máximo y detener cuando es posible los procesos de germinación, pero sin llegar a provocar la pérdida de viabilidad en la semilla. Las características fisiológicas de los diferentes tipos de semillas permiten manejar en distinto grado los parámetros esenciales sin perder viabilidad.

Las semillas recalcitrantes se caracterizan por una baja tolerancia a la desecación, lo que provoca que sus posibilidades de conservación a largo plazo se vean enormemente disminuidas. Es difícil identificar causas específicas de la baja tolerancia a la desecación en este tipo de semillas aunque cabe esperar que sea una combinación de factores. Aparentemente, al menos dos componentes clave están relacionados con la tolerancia a la desecación por parte de las semillas: la capacidad de pasar por estados de bajo contenido de humedad sin incurrir en disfunciones metabólicas y daños por oxidación; y la capacidad para prevenir o disminuir el efecto de la salida del agua de la estructura de membranas y macromoléculas. Las semillas recalcitrantes carecen en mayor o menor grado de estas cualidades (BRADFORD, 2004).

Dado que en las semillas recalcitrantes, la humedad no puede ser el factor clave en la ralentización del proceso de germinación, el éxito en el almacenamiento de este tipo de semillas requiere el manejo de los otros dos factores esenciales: temperatura y aireación.

Bajas temperaturas y limitación en el intercambio gaseoso, contribuyen a detener la germinación. No obstante, temperaturas demasiado bajas o ausencia total de intercambio gaseoso pueden provocar la muerte embrionaria. Se trata pues de encontrar niveles de temperatura y aireación suficientes pero no excesivos.

Uno de los problemas relacionados con la conservación a temperaturas inferiores a 0°C se deriva de la congelación masiva del agua en los tejidos de la semilla, lo que puede provocar daños irreversibles por lisis celular.

Pese a no soportar la desecación total, las semillas recalcitrantes sí toleran un cierto rango de secado, que provoca la disminución de la humedad en el pericarpo afectando en menor medida al embrión (FINCH-SAVAGE, 1998). Este tipo de procedimientos, podrían disminuir los daños por congelación, aumentando así la resistencia a las bajas temperaturas de las semillas recalcitrantes.

Condiciones de almacenamiento a bajas temperaturas con niveles restringidos de intercambio gaseoso, aplicadas sobre semillas con bajo contenido en humedad, podrían constituir por tanto una opción interesante de cara a la conservación de semillas recalcitrantes.

La encina (*Quercus ilex* subsp. *ballota*) es una especie que manifiesta cierta vecería, es decir, se caracteriza por una producción interanual irregular. Su fruto, la bellota, es un ejemplo de semilla recalcitrante y su conservación reviste especial interés por la necesidad de almacenar material sobrante en los años de cosecha muy abundante, y guardarla así para los años menos productivos. Incluso dentro de un mismo año, algunos autores señalan el interés de poder conservar la bellota desde su recolección en noviembre hasta su siembra (febrero-marzo) y evitar así la influencia en campo de agentes nocivos bióticos y abióticos (ZULUETA y MONTOTO, 1992).

En el presente trabajo, se pretende abordar una primera aproximación al modo en que distintos niveles de humedad, afectan al mantenimiento de la viabilidad en bellotas de encina sometidas a congelación (-4°C) a lo largo de tiempos de almacenaje variables.

MATERIAL Y MÉTODOS

Durante la última semana del mes de Octubre de 2003, se llevó a cabo la recolección de la producción de bellota de una encina situada en la provincia de Guadalajara, término municipal de Chiloeches. Las semillas recolectadas se separaron aleatoriamente en cinco lotes de aproximadamente cinco kilos cada uno y se aplicó el proceso de adecuación de la humedad correspondiente en cada caso (previamente se llevaron a cabo ensayos para determinar la curva de secado de las bellotas analizadas):

- a. Saturación: inmersión en agua durante 48 horas.
- b. H7: secado en estufa a 40°C durante 7 horas (pérdida hum. esperada: 4%).
- c. H15: secado en estufa a 40°C durante 15 horas (pérdida hum. esperada: 8%).
- d. H30: secado en estufa a 40°C durante 30 horas (pérdida hum. esperada: 15%).
- e. Testigo: ningún tratamiento.

Una vez finalizado el secado, se subdividió cada lote en cinco grupos de aproximadamente 125 bellotas, correspondientes a los distintos tiempos de almacenamiento: 0, 2, 4, 8 14 y 22 meses. Se eliminaron las bellotas podridas y aquellas que presentan daños visibles de perforadores (*Balaninus* sp.) y los grupos (excepto los de tiempo 0, que se siembran inmediatamente) se almacenaron separadamente en bolsas de polietileno de 15 µm de espesor (galga 60, galga inferior a los 100-250 propuestos por GORDON (1977) en YUSTE, 2002) a -4°C (un grado por debajo de lo propuesto por FINCH-SAVAGE, 1998).

Los ensayos de germinación se llevaron a cabo por siembra en bandejas sobre lecho de arena esterilizada. Se sembraron en cada bandeja 125 bellotas y se consideraron, de cara al control de germinación, cinco bloques de 25 bellotas correspondientes a las filas de siembra. Las condiciones de humedad y temperatura durante la germinación y el establecimiento, se mantuvieron constantes durante todos los ensayos. Tras realizarse la siembra, en cada ocasión se realizaron tres controles de germinación: al mes, a los dos meses y a los dos meses y medio. En todos los casos se contabilizaron separadamente las bellotas que emitieron sólo la radícula, y aquellas que emitieron radícula y epicotilo.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los porcentajes medios de germinación de los 14 primeros meses de experimentación, son los que se muestran en la tabla 1 y se representan en las Figuras 1 y 2. Ambos ponen de manifiesto la influencia del tiempo de almacenamiento y la humedad de la bellota en el momento de la congelación, sobre su capacidad de germinación.

Antes de la congelación (tiempo cero) los grupos con mejor comportamiento son Saturación y Testigo (tasa de germinación inicial del 98 y el 90% respectivamente). Concretamente, el lote de Saturación tiende hacia valores de germinación más altos que el testigo en este punto inicial, lo que vendría a indicar la bondad de este tratamiento cuando el objetivo de un lote de bellotas es su siembra inmediata. Esta tendencia va en la línea de lo indicado por GOSLING (1988), no obstante, según la prueba de Mann-Whitney en el caso de la germinación epigea no se trata de una tendencia significativa, y para la germinación radical nos encontramos en el límite de la significación verdadera (p -valor=0,032).

El proceso de secado por sí mismo sólo parecen haber afectado de forma severa a la viabilidad de las bellotas en el lote de las 30h (humedad final del 35%, pérdida de humedad del 12%), que ve disminuida su capacidad germinativa un 50% con respecto al testigo en el momento inicial. Este comportamiento concuerda con lo apuntado por ZULUETA y MONTOTO (1992) que fijan una importante disminución en la germinación de la bellota de encina a partir de una pérdida del 15% de humedad, siendo ésta total para el 20%.

En el caso del lote 7 horas no se han producido pérdidas aparentes en el proceso de secado; el lote 15 horas se encuentra en media tras el secado un 10% por debajo del comportamiento del testigo, aunque esta diferencia no resulta significativa.

A partir de los dos meses de almacenamiento los grupos correspondientes a 7 y 15 horas de secado en estufa pasan a ser los de mejor comportamiento, superando el comportamiento del testigo en aproximadamente un 20% de capacidad germinativa. En el último tiempo de muestreo, el lote de 15 horas parece incluso haber mantenido la viabilidad mejor que el de 7h, no obstante será necesario esperar a los 22 meses de almacenamiento para confirmar esta tendencia.

El lote de saturación, pese a presentar las mejores tasas de germinación iniciales, sufre una elevada pérdida de capacidad germinativa como consecuencia de la congelación. Su comportamiento acaba siendo tan malo como el del

lote de 30h.

El lote 30 horas es sin duda el que manifiesta un comportamiento peor, con una tasa de germinación inicial del 40% y una germinación final cercana al 0%.

En el control tras dos meses de congelación, tres de los cinco lotes analizados dan valores de germinación atípicos (inferiores en algunos casos a los del control de los 4 meses). Este hecho pudo ser debido a una infección de larvas de dípteros sufrida con especial virulencia en esas bandejas y que ocasionó daños letales en un cierto número de bellotas.

Con respecto a la evolución temporal media de la capacidad germinativa, el punto de inflexión en la conservación de las bellotas en congelación, parece encontrarse entre los dos y los cuatro meses. A partir de este punto comienza un descenso más rápido de la viabilidad de las semillas, en general de pendiente similar en todos los casos. Este tipo de comportamiento se aproxima al espíritu de los modelos descritos por ELIS & ROBERTS (1980,1981), para la estimación de la longevidad potencial de las semillas y el efecto de las condiciones de almacenamiento sobre la viabilidad de las mismas. Se trata de modelos en los que se postula que la velocidad de pérdida de viabilidad (pendiente de la recta) en las semillas a partir de un cierto punto depende únicamente de la especie. Conseguir mejorar la longevidad de un lote de semillas dependerá por tanto de la tasa de germinación con la que se alcance ese punto. Confirmar el funcionamiento de este tipo de modelos en las bellotas de encina, requerirá ulteriores experimentos.

Para confirmar si las tendencias y diferencias antes indicadas resultan o no significativas, se considera un diseño bifactorial completo con la variable %Germinación Radical como variable dependiente y el tiempo de secado y el tiempo de almacenamiento como factores fijos, y se lleva a cabo un análisis ANOVA univariante. Los resultados de este análisis se muestran en la Tabla 3 adjunta. (se plantea el mismo diseño con la germinación epigea como variable dependiente obteniendo resultados similares a los del diseño radical).

Tanto el efecto de los factores como el de la interacción entre ellos, resultan significativos (p -valor $<0,05$). Dentro de las categorías de cada uno de ellos, los análisis post-hoc (Bonferroni, Tukey), agrupan las categorías como sigue:

- Tiempo de almacenamiento: se encuentran diferencias significativas entre todos los tiempos salvo entre los 2 y los 4 meses, que forman un grupo.
- Tiempo de secado: todos los lotes presentan comportamientos significativamente diferentes, salvo los correspondientes a los tiempos 7 y 15 horas que quedan agrupados.

Destacar en este punto la importancia de este último resultado, dado que, como se muestra en la Tabla 2 adjunta, la humedad final de estos dos lotes es prácticamente la misma, pese a que las pérdidas de humedad que han sufrido cada uno de ellos en el tratamiento de secado son significativamente diferentes (4% y 8% respectivamente). El motivo no es otro que, a pesar del tratamiento de homogeneización de las bellotas previa formación de los lotes, el lote destinado a las 15 horas de secado quedó con una humedad de partida inicial superior a la del lote de las 7 horas. El secado diferencial posterior contribuyó a igualar la humedad final de los lotes. El hecho de que sea la humedad final y no la pérdida sufrida, lo que determine la evolución de la tasa de germinación de las bellotas, viene a indicar la importancia que podría tener describir los tratamientos de almacenaje en términos de humedad final alcanzada por los lotes y no tanto por la pérdida de humedad infringida.

El estudio de la evolución de la tasa de germinación (Figuras 3 y 4) a lo largo de los dos meses y medio en que se controla cada muestra en las bandejas de arena, pone de manifiesto que entre el control del primer mes y el del segundo, aún se producen aumentos notables en el tanto por ciento de germinados (tanto para radícula como para epicotilo). Estos aumentos son más pronunciados cuanto menor es la humedad del lote. Entre los 60 y los 75 días, apenas si se producen nuevas germinaciones, aunque el escaso aumento observado sigue siendo mayor para las bellotas más secas. Dado que la germinación requiere la absorción por parte de la semilla de una cantidad de agua suficiente como para permitir el hinchado de la radícula y la consiguiente rotura de la testa (CARDILLO, 2001) parece lógico que aquellas bellotas que parten de una humedad menor, tarden más tiempo en absorber la humedad necesaria para la germinación. Es quizá debido a esta alteración de la concentración de humedad en los lotes así como a los procesos de congelación, que los tiempos encontrados como necesarios superan los 28 días recomendados por la I.S.T.A. (1995).

En cuanto a la relación entre la germinación parcial (radícula) o total (radícula+epicotilo), se constata que el porcentaje medio del total de bellotas que emiten radícula pero no epicotilo es de un 13,6%. Este porcentaje medio no varía de forma significativa entre las categorías consideradas para las variables tiempo y humedad. No obstante, los valores obtenidos son en ocasiones muy dispares (0-36%) lo que indica que existen factores ajenos a los estudiados que condicionan este fenómeno. Este proceso se ha observado a lo largo de todo el experimento, generalmente unido a daños externos sobre las células correspondientes al epicotilo después de producirse la salida de la radícula. En condiciones normales estas células permanecen en el interior del pericarpo hasta que una elongación intercalar de los cotiledones, las saca al exterior protegidas por éstos (CARDILLO, 2001). El período que transcurre desde la apertura de la testa para la salida de la radícula y la elongación del epicotilo, es crítico de cara a su supervivencia. Tanto la apertura de la testa como su posterior salida al exterior bajo la protección de los cotiledones, son momentos de enorme fragilidad ante el ataque de plagas y enfermedades así como para roturas y efectos negativos del ambiente (exceso de humedad, frío...).

CONCLUSIONES

El tratamiento de conservación a -4°C permite mantener una cierta capacidad de germinación al menos durante catorce meses de almacenamiento. Sin realizar ningún tipo de tratamiento sobre la bellota, se han obtenido tasas del 50% de germinación radical a los ocho meses, descendiendo este valor hasta el 30% al cabo de los 14 meses. Bellotas con tratamientos de secado llegan a alcanzar tasas de germinación radical del 70% a los ocho meses y del 55% a los 14.

En los lotes analizados, tanto la humedad como el tiempo de almacenaje han resultado influir de forma significativa en la viabilidad de las bellotas de encina (*Quercus ilex* subsp. *ballota* L.):

- La inmersión en agua de las semillas durante 48 horas, mejora la tasa de germinación de las bellotas y su velocidad cuando se siembran inmediatamente después del tratamiento. Procesos de almacenamiento a -4°C provocan elevados índices de mortalidad sobre bellotas con este aumento de humedad.
- Desecaciones entre el 4 y el 8% mejoran el mantenimiento de la viabilidad de la semilla cuando ésta es conservada a bajas temperaturas durante períodos de tiempo superiores a 2 meses.
- Pérdidas de humedad superiores al 12% producen descensos notables en la viabilidad de los lotes de semillas.
- El tiempo de almacenamiento a -4°C disminuye la tasa de germinación de las bellotas. Se distinguen dos fases dentro del período de almacenamiento: desde el inicio hasta los 2-4 meses de almacenamiento, el efecto del tiempo no es el mismo para todos los tratamientos, ocurriendo que mayor contenido de humedad implica mayor pérdida de viabilidad; a partir de los cuatro meses, la velocidad de pérdida de viabilidad tiende a ser la misma en casi todos los lotes.

A partir de los experimentos realizados, se deduce que, en el caso de lotes sometidos a alteraciones de humedad y temperatura, una duración de los ensayos de germinación de 60 días, resulta más adecuada que la de 30 días. La consideración del dato de germinación a los treinta días como definitivo, infravalora (y de forma no homogénea para los distintos porcentajes de humedad) la capacidad de germinación de los lotes.

La relación entre la germinación parcial (emisión de radícula) y total (emisión de radícula y epicotilo) no ha resultado depender de los factores relativos al almacenamiento estudiados (humedad y tiempo de almacenaje), sino más bien de posibles daños bióticos o abióticos acaecidos durante el período de germinación de las semillas.

BIBLIOGRAFÍA

- BRADFORD, K.J.; 2004. *Seed Production and Quality*. University of California. Florida.
- CARDILLO, E.; 2001. *La germinación en Quercus suber. Definición. Proceso. Factores condicionantes. Análisis de germinación. Datos en Extremadura*. Instituto CMC-IPROCOR. Junta de Extremadura.
- ELIS, R.H.; ROBERTS, E.H.; 1980. Improved equations for the prediction of seed longevity. *Ann. Bot.* 45: 13-30.
- ELIS, R.H.; ROBERTS, E.H.; 1981. The quantification of ageing and survival in orthodox seeds. *Seed Sci. & Technol.* 9: 373-409.
- FINCH-SAVAGE, W.E.; 1998. *Farm Woodland Tree Seed*. Horticulture Research International. Warwick.
- GOSLING, P.; 1988. The effect of drying acorns to different moisture contents, followed by storage, either with or without imbibition. *Forestry*. 62:41-50.
- I.S.T.A.; 1985. *International Rules for Seed Testing: Rules 1985*. International Seed Testing Association.
- YUSTE, J.A.; *Estudio de la influencia de los distintos medios en la conservación de semillas recalcitrantes en especies del género Quercus. Aplicación a Q.suber y Q. Pyrenaica*. TFC. E.U.I.T.Forestal, U.P.M. Madrid.
- ZULUETA, J. DE y MONTOTO, J.L.; 1992. Efectos de la temperatura y humedad en la germinación de bellotas de encina (*Quercus ilex* L.) y alcornoque (*Quercus suber* L.). *Invest. agrar., Sist.recur.for.* 1(1):65-71.

Tabla 1.- Tasa media de germinación obtenida en los distintos lotes de humedad para los tiempos considerados. % Germinación a los 60 días.

Tiempo desecación	Tiempo Congelación (meses)	%Germinación media (radícula)	%Germinación media (epicotib)
Saturación	0	98,0	92,0
	2	45,6	24,0
	4	48	36,8
	8	13,6	9,6
	14	0,8	0,8
Testigo	0	89,6	81,6
	2	57,6	44,8
	4	64,8	44,8
	8	48,8	34,4
	14	27,2	16,0
7h	0	89,6	80,0
	2	92	71,2
	4	84	78,4
	8	69,6	64,8
	14	35,2	28,0
15h	0	80	64,8
	2	87,2	77,6
	4	77,6	63,2
	8	70,4	57,6
	14	54,4	41,6
30h	0	62,4	48,0
	2	40,8	22,4
	4	41,6	23,2
	8	24,8	12,0
	14	1,6	0,8

Tabla 2.- Resultados de los ensayos para la adecuación de la humedad en los lotes de bellotas

Lote	Pérdida humedad esperada	Pérdida obtenida	Humedad final
Saturación	- 2%	-1,89	51,1
Testigo	0	0	46,49
7h	4%	4,37	42,16
15h	8%	7,85	41,55
30h	12%	12,14	35,14

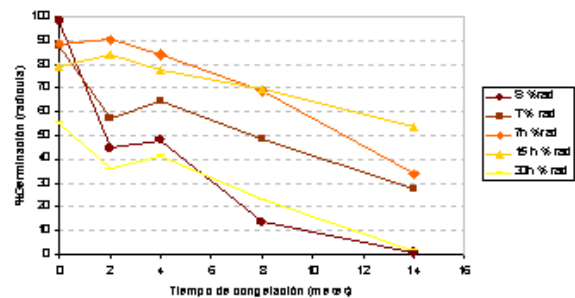


Fig. 1.- Evolución de la tasa media de germinación (emisión de radícula) en los distintos lotes de humedad para los tiempos considerados. % Germinación a los 60 días.

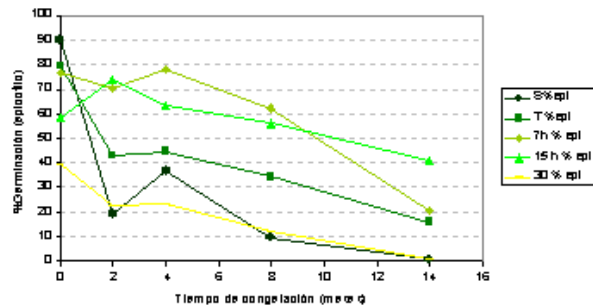


Fig. 2.- Evolución de la tasa media de germinación (emisión de radícula+epicotilo) en los distintos lotes de humedad para los tiempos considerados. % Germinación a los 60 días.

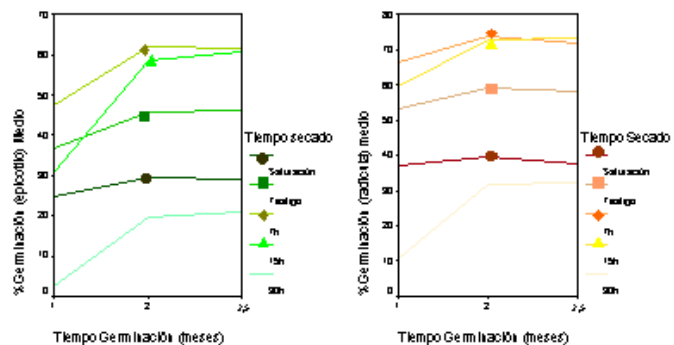


Fig. 3 y 4.- Evolución del % medio de germinación (epicotilo+radícula, sólo radícula) para los distintos lotes de humedad, a lo largo de los tres tiempos de control de los ensayos de germinación: 1 mes, 2 meses, 2,5 meses.

Tabla 3.- Resultados del análisis ANOVA univariante para el diseño bifactorial completo con la variable %Germinación Radical como variable dependiente y el tiempo de secado y el tiempo de almacenamiento como factores fijos

f	Suma de cuadrados tipo III	df	Media cuadrada	R cuadrado	Sig.
Modelo corregido	95624,959(b)	24	3984,373	73,838	,000
Intercept	382989,152	1	382989,152	7097,543	,000
TPO_CONG	48726,241	4	12181,560	225,748	,000
TPO_SECA	36717,105	4	9179,276	170,110	,000
TPO_CONG * TPO_SECA	10181,613	16	636,351	11,793	,000
Error	5396,081	100	53,961		
Total	484010,192	125			
Total corregida	101021,040	124			

a Calculado con alfa = ,05

b R cuadrado = ,947 (R cuadrado corregida = ,934)