

MÉTODO RÁPIDO DE VALORACIÓN DE LA VIABILIDAD DE BELLOTAS DE *Quercus ilex* L. MEDIANTE TÉCNICAS CROMATOGRÁFICAS

E. Sobrino Vesperinas & E. Casado Fernández

Departamento de Producción Vegetal, Botánica y Protección Vegetal. ETSIA. 28040 MADRID.

RESUMEN

Se estudia la producción de CO₂ de muestras de bellotas de encina (*Quercus ilex* L.) sometidas a diferentes temperaturas (-10 °C, 2 °C, 4 °C, 12 °C, 20 °C) mediante análisis de la atmósfera de confinamiento por cromatografía gaseosa (O₂, N₂, CO₂ y etileno). Se encuentra que la respiración a 20 °C resulta ser 3,2 veces superior a la producida a 2 °C, por lo que resulta recomendable la conservación de estas semillas recalcitrantes en el entorno de esta temperatura. Basándose en la determinación de un cociente respiratorio igual a la unidad se considera que el substrato respiratorio está constituido por carbohidratos.

Considerando la elevada actividad metabólica de las bellotas de encina, se propone un nuevo método rápido de valoración de la viabilidad de las bellotas, no destructivo y aplicable también a otras semillas recalcitrantes. Se propone un test de viabilidad, que se realiza confinando un peso definido de bellotas (75 g, aproximadamente 25 bellotas) en un contenedor hermético de vidrio de 1 l, dotado de un septum de silicona para extracción de muestra para cromatografía gaseosa y conservado durante 24 horas en cámara a 20 °C. Niveles elevados de producción de CO₂ indican semillas con niveles adecuados de viabilidad. Se ha encontrado que bellotas con niveles de respiración capaces de gene-

rar 12,11% de CO₂ en un periodo de 120 horas a 20 °C, les corresponde una germinación del 92%.

Palabras clave: Encina, *Quercus ilex*, germinación, bellota, semilla recalcitrante, cromatografía gaseosa.

INTRODUCCIÓN

La reintroducción del encinar, así como de otras formaciones arbóreas autóctonas de la Península Ibérica constituye un objetivo medio-ambiental relevante en las condiciones actuales, en las que la presión humana sobre los ecosistemas de tipo climácico, está llevando a estos a situaciones límite.

Como consecuencia de la fuerte erosión del suelo, derivada de la eliminación de la cobertura vegetal, especialmente acusada en aquellas zonas con pendiente, ha quedado en muchos casos fuertemente reducida la capacidad de almacenamiento de agua en el suelo, por lo que las condiciones de aridez se hacen más acusadas. Una de las consecuencias de este problema es el incremento en la dificultad de reintroducción de las especies arbóreas originales.

La reintroducción de las diferentes especies del género *Quercus* puede efectuarse tanto mediante trasplante de plantas de 1 ó 2 savias como mediante la siembra de bellotas. Este

último método es defendido por algunos autores en las difíciles condiciones de la Región Mediterránea. En concreto MESON & MONTOLYA (1993) consideran que la siembra de bellotas puede permitir la consecución de una mayor profundidad de la vigorosa raíz pivoteante característica del género *Quercus*, que puede alcanzar 1 m de profundidad en el año de germinación, y constituye una relativa garantía frente a las dificultades climáticas. En contrapartida las plantas transplantadas procedentes de contenedores forestales experimentan un retraso en el crecimiento de la raíz, que puede tener graves consecuencias para la supervivencia, al secarse los horizontes superiores del suelo durante la época estival.

En condiciones limitantes por la escasez de precipitaciones, profundidad y/o textura del suelo, una práctica tradicional, consiste en la eliminación de la parte aérea de las siembras, que en ocasiones también puede secarse de manera natural, para rebrotar posteriormente, potenciándose así el sistema radicular frente al aéreo.

La siembra de bellotas, que se engloban dentro de las semillas sensibles a la desecación, obliga a determinar de forma previa a su empleo, la capacidad germinativa de cada lote con objeto de garantizar la actuación. Sin embargo el método propuesto por ISTA (INSPV, 1977) se prolonga durante un largo tiempo, 28 días desde su inicio, ya que en ese momento es cuando se efectúa el segundo conteo. Para lotes de semillas de encina conservados en condiciones inadecuadas, la capacidad germinativa puede verse modificada durante el transcurso de cortos períodos de tiempo.

Por este motivo se propone aquí, un nuevo método de valoración de la germinación basado en la cromatografía gaseosa, que puede ser completado en tan solo unas horas y además no resulta destructivo. El método aprovecha el hecho de que las bellotas contienen semillas denominadas recalcitrantes frente a las de tipo ortodoxo, que son las más comunes.

Las semillas recalcitrantes alcanzan la maduración con un contenido en humedad elevado,

en el caso de *Quercus ilex* del orden del 40%, y este nivel debe ser mantenido para conservar la viabilidad de las semillas. Este tipo de semillas presenta problemas para su conservación durante largos períodos de tiempo. Las semillas recalcitrantes suelen pertenecer a árboles de clima tropical, pero también se incluyen en este grupo especies arbóreas de clima templado (BESNIER, 1989). La reducción de humedad en las bellotas de encina produce una reducción de la germinación, que cuando alcanza el 30% de la humedad inicial, esta se anula, tal y como han puesto de manifiesto DE ZULUETA & MONTOTO (1992). FINCH-SAVAGE (1992) también ha puesto en evidencia la existencia de un contenido de humedad crítico en bellotas de *Quercus robur* L. en relación con la germinación.

De esta manera, el comportamiento de las semillas recalcitrantes es esencialmente diferente del correspondiente a las semillas ortodoxas, que mantienen mejor su viabilidad cuando se conservan con bajo contenido de humedad. Incluso se utiliza para ellas la siguiente regla: El período de almacenamiento en condiciones de viabilidad se duplica por cada 1% de descenso en la humedad de la semilla (HARRINGTON, 1959). Esta regla tiene aplicación como técnica estándar. La actividad metabólica de las bellotas es muy elevada, y casi presenta mayor similitud con la correspondiente a la de frutos carnosos, que a la de las semillas ortodoxas, que es tan reducida que resulta difícilmente detectable, excepto por cromatografía gaseosa.

En el presente trabajo se estudia la intensidad respiratoria aparente y el desprendimiento de etileno de muestras de bellotas de encina, mantenidas a diferentes temperaturas, mediante cromatografía gaseosa, así como el valor de la germinación. Proponiéndose finalmente un nuevo método de valoración de la viabilidad de las bellotas rápido y no destructivo.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se han utilizado bellotas de encina [*Quercus ilex* L. subsp. *rotundifolia* (Lam.)

O. SCHWARZ] recolectadas en el momento de alcanzar la madurez en el mes de Noviembre, procediendo todas ellas de un único árbol de un encinar adhesado en la localidad de Boadilla del Monte (Madrid).

Para llevar a cabo el control de la producción de CO₂ de las bellotas, se depositaron estas en contenedores de vidrio de 580 ml provistos de un cierre hermético y de un circuito externo de goma, el cual permite la extracción de muestras de la atmósfera confinada sin alterar de manera fundamental el sistema.

Se utilizaron 10 bellotas por contenedor con un peso medio de 42,52 g y un volumen medio de 36 ml. Las bellotas se eligieron libres de parásitos.

Como variables independientes se tomaron cinco niveles de temperatura, para lo que fue preciso utilizar cinco cámaras frigoríficas diferentes, reguladas a las siguientes temperaturas: -10 °C, 2 °C, 4 °C, 12 °C y 20 °C.

La determinación de la respiración se efectuó mediante el control de la variación del contenido de O₂, N₂ y CO₂ en la atmósfera confinada en un tiempo determinado (120 horas), mediante cromatografía gaseosa con tres repeticiones. Adicionalmente se analizó el contenido de etileno (C₂H₄).

Se utilizó un cromatógrafo Varian 3700

utilizando la metodología debida a MERODIO & DE LA PLAZA (1989) para el análisis cromatográfico simultáneo de O₂, N₂, CO₂ y etileno. Las condiciones de trabajo fueron: Columna 50 °C; inyector 100 °C; detector de conductividad térmica 100 °C ; detector de ionización de llama 150 °C. La separación de los gases se realizó mediante dos columnas conectadas en serie mediante una válvula de 6 vías. El gas portador fue helio con un flujo de 25 ml por minuto. La inyección se realizó de forma única con una muestra de 1 ml.

El cromatógrafo de gases se verificó previamente a la realización de los análisis mediante una mezcla conocida de gases (N₂, O₂, CO₂ y etileno).

Se determinó el cociente respiratorio definido como la relación existente entre el CO₂ liberado en el proceso y el O₂ consumido (BARCELÓ & *al*, 1982). La germinación de las bellotas se efectuó de acuerdo con las normas ISTA (INSPV, 1977).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En la tabla 1 se agrupan los resultados obtenidos en los análisis de la atmósfera confinada de los contenedores herméticos, conteniendo bellotas conservados durante 120 horas a las distintas temperaturas utilizadas en este trabajo. Se recogen los valores

Tabla 1. Contenido en O₂ (%), N₂ (%), CO₂ (%) y etileno (C₂H₄) (ppm) determinadas por cromatografía de gases, en función de la temperatura en una atmósfera confinada originada por un peso medio de 42,52 g en un contenedor hermetico con volumen util de 544 ml. durante 120 horas.

Temperatura (°C)	Temperatura (°K)	O ₂ (%)	N ₂ (%)	CO ₂ (%)	C ₂ H ₄ (ppm)
-10	263	21,8±0,6	78,0±1,4	0,2±0,02	—
2	275	16,7±0,4	79,5±1,2	3,8±0,1	—
4	277	16,6±0,3	79,6±1,5	4,3±0,2	0,09±0,01
12	285	14,3±0,3	78,7±1,3	7,0±0,1	0,11±0,01
20	295	9,2±0,2	78,3±1,4	12,4±0,3	0,29±0,03

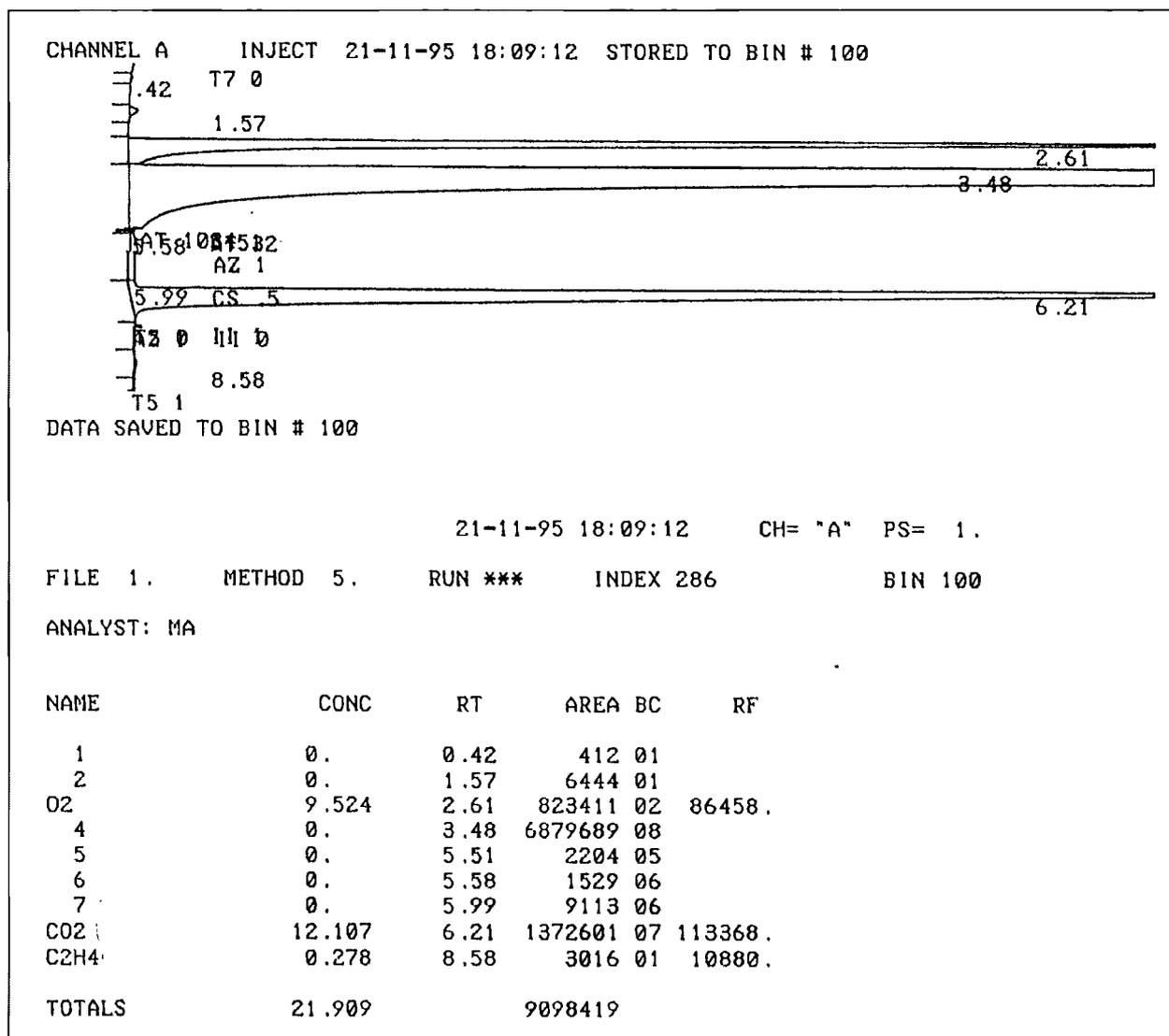


Fig.1. Cromatograma obtenido de la atmosfera confinada producida por 42,52 g de bellota de encina (*Quercus ilex*) a 20 °C durante 120 horas.

medios ajustados para el peso medio de bellotas de, oxígeno (%), nitrógeno (%), dióxido de carbono (%) y etileno (ppm) para cada temperatura. En la fig. 1 se muestra uno de los cromatogramas realizados en la atmósfera confinada correspondiente a un contenedor conservado a 20 °C y la integración automática de la superficie de cada uno de los picos considerados.

Al aumentar la temperatura de conservación de las bellotas, se incrementa la respiración y consecuentemente el oxígeno disminuye desde un 21,81 % en la atmósfera producida a -10 °C hasta un contenido de 9,52 %

en la generada a 20 °C. Entre 2 °C y 20 °C, la actividad respiratoria se multiplica por un factor = 3,20. Este resultado pone de manifiesto de manera cuantitativa la influencia de la temperatura en el consumo de las reservas de la bellota, y la importancia de la conservación de las semillas recalcitrantes a bajas temperaturas (entre 2 °C y 4 °C). Estos niveles de temperatura están en línea con los recomendados por CATALÁN (1991) para bellotas de *Quercus robur*, que establece entre 0° y 2 °C.

El cociente respiratorio, efectuado sobre el conjunto de análisis realizados muestra un

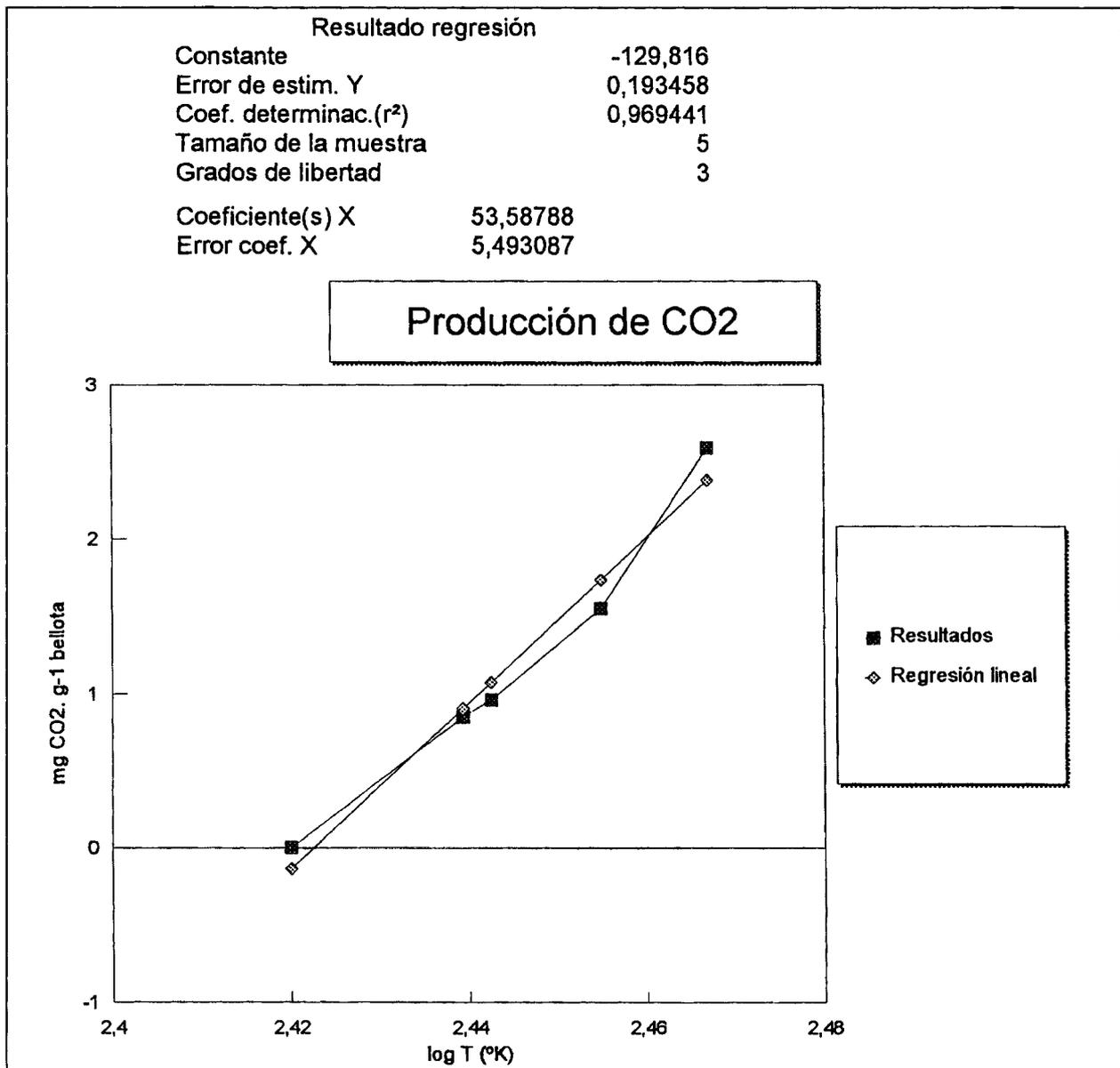


Fig. 2. Valores medios correspondientes a la producción de CO₂ en función del logaritmo decimal de la temperatura absoluta, correspondientes a una atmósfera confinada con un peso medio de bellotas de encina (*Quercus ilex*) de 42,52 g y un contenedor con volumen útil medio de 544 ml. La regresión lineal calculada se indica en la parte superior.

valor QR = 1,01, muy próximo a la unidad, por lo que cabe considerar que el sustrato respiratorio es un carbohidrato, que es oxidado completamente.

La fig. 2 representa la producción de CO₂ obtenida para 120 horas y expresada como mg CO₂. g⁻¹ bellota para las diferentes temperaturas. El conjunto de puntos se ha ajustado mediante regresión lineal (r² =

$$0,97): y = 53,59 \log T - 129,82.$$

Generalmente se considera que el etileno es un promotor del proceso de envejecimiento. En estudios efectuados sobre frutos se encuentra que la iniciación autocatalítica de etileno requiere la presencia en la atmósfera de un 6-7% de oxígeno como mínimo, aunque una vez iniciada, la producción solo se inhibe por una anoxia completa (BARCELÓ

& al., 1982). FINCH-SAVAGE & CLAY (1994) estudiando semillas recalcitrantes de *Quercus robur* indican que la interacción entre etileno, luz y ácido abscísico inhiben la germinación en esta especie.

Tomando como base, los resultados obtenidos en el proceso respiratorio en atmósfera confinada, en este tipo de semillas recalcitrantes, se presenta un método de evaluación rápida de la capacidad germinativa de una muestra de bellotas de encina, mediante cromatografía de gases. Con objeto de tipificar la nueva metodología se fijan a continuación los diferentes parámetros a utilizar, de manera que los análisis efectuados en diferentes laboratorios puedan ser comparativos.

El método rápido de análisis de la viabilidad en bellotas de encina propuesto, se efectúa manteniendo durante 24 horas en cámara de 20 °C una muestra representativa de bellotas de 75 g (aproximadamente 25 bellotas), aisladas en un contenedor hermético con un volumen de 1 l, accesible mediante un septum de silicona, para la toma de una alícuota de la atmósfera confinada mediante la utilización de una jeringuilla. La inyección de 1 ml de la muestra de la atmósfera confinada en el cromatógrafo de gases proporciona la actividad respiratoria de la muestra, utilizando la metodología de MERODIO & DE LA PLAZA (l.c.). De acuerdo con los resultados obtenidos, niveles de intensidad respiratoria del orden de 2,4% de CO₂ o superiores en 24 horas a 20 °C, indicarían semillas viables (peso medio 42,52 g y volumen útil medio 544 ml). El método podría ser aplicable con los ajustes necesarios a otras semillas recalcitrantes y de forma más específicas a la de otras especies del género *Quercus*.

Queda pendiente para futuras experiencias, el estudio de la posible correlación entre niveles respiratorios y porcentaje de germinación, e incluso el estudio de la correspondencia con el vigor germinativo de las semillas, definido este como la rapidez con que las semillas germinan. También de interés resulta el estudio comparativo entre respiración y contenido de humedad de las bellotas, al tratarse de un aspecto tan importante en la

germinación.

Sin embargo, la metodología propuesta puede resultar de utilidad ya que para acometer una repoblación, deben utilizarse bellotas en óptimas condiciones de viabilidad, y permitiría por su rapidez, efectuar determinaciones de forma inmediatamente anterior a la ejecución de la repoblación.

CONCLUSIONES

1. Se valora por cromatografía de gases, los diferentes niveles de producción de CO₂ por parte de bellotas de encina, confinadas en un contenedor hermético, encontrando que la obtenida a 20 °C resulta ser 3,2 veces superior a la obtenida a 2 °C.

2. La elevada intensidad respiratoria de las bellotas de encina en condiciones de confinamiento en recipiente hermético, determina el consumo del O₂ disponible, alcanzando en consecuencia rápidamente condiciones de hipoxia.

3. Se propone una temperatura de 2 °C, como temperatura de conservación de bellotas de encina, desde un punto de utilización más lenta de las reservas.

4. El cociente respiratorio determinado es igual la unidad, por lo que se considera que el substrato respiratorio está formado por carbohidratos.

5. Se propone un método rápido para la valoración de la viabilidad de bellotas de encina basado en el análisis por cromatografía gaseosa del CO₂ producido en atmósfera confinada. El método es tipificado para hacer posible la comparación de resultados.

6. El método de análisis propuesto se considera que puede ser aplicado a otras semillas recalcitrantes y específicamente a las del género *Quercus*.

Agradecimiento

Agradecemos la ayuda y consejos prestados por el Prof. D. Jose Luis De La Plaza y por D. Miguel Angel Martínez del Instituto

del Frío (CSIC) así como por las facilidades dadas para la utilización del cromatografo de gases y cámaras frigoríficas de ese Instituto.

BIBLIOGRAFÍA

BARCELÓ, J., NICOLÁS, G., SABATER, B. & SÁNCHEZ-TAMES, R.; 1983. *Fisiología Vegetal*. Ed. Pirámide, Madrid.

BESNIER, F.; 1989. *Semillas. Biología y tecnología*. Ed. Mundi-Prensa, Madrid.

DE ZULUETA, J. & 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.

CATALÁN, G.; 1991. *Semillas de arboles y arbustos forestales*. ICONA (MAPA), Madrid.

FINCH-SAVAGE, W.E.; 1992. Embryo water status and survival in the recalcitrant species *Quercus robur*L.: Evidence for a

critical moisture content. *Journal of Experimental Botany*, 43: 663-669.

FINCH-SAVAGE, W.E. & CLAY, H.A.; 1994. Evidence that ethylene, light and abscisic acid interact to inhibit germination in the recalcitrant seeds of *Quercus robur* L. *Journal of Experimental Botany*, 45: 1295-1299.

HARRINGTON; 1959. In: *Proceedings 1959 Short Course for seedsmen*, pp. 89- 107. Mississippi State University, USA.

INSPV; 1977. *Reglas internacionales para ensayos de semillas*. Ministerio de Agricultura, Madrid.

MESÓN, M. & MONTOYA, J.M.; 1993. *Silvicultura mediterranea*. Ed. Mundi-Prensa, Madrid.

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.