

INFLUENCIA DE LA TEMPERATURA Y COMPOSICIÓN DE LA ATMÓSFERA EN LA CONSERVACIÓN DE LA CAPACIDAD GERMINATIVA DE SEMILLAS DE *ARAUCARIA ANGUSTIFOLIA* (BERT.) O. KUNTZE ALMACENADAS POR UN PERÍODO PROLONGADO.

Piriz Carrillo, V.*; Fassola, H.**; Chaves, A.* y Mugridge, A.*

RESUMEN

El objetivo del presente trabajo fue optimizar un procedimiento conducente a prolongar el tiempo de almacenamiento de semillas de *Araucaria angustifolia* (Bert.) O. Kuntze, sin pérdida de la capacidad germinativa, por un período de dos años, con el fin de paliar los problemas de ciclicidad típica de ésta especie y de ésta manera poder programar la siembra, tanto en vivero como a campo. Para la realización de los ensayos se utilizaron semillas de *Araucaria angustifolia* provenientes del área de distribución natural del Departamento Manuel Belgrano, ubicado en la localidad de San Antonio, Provincia de Misiones-Argentina. Se confeccionaron bolsas con las películas plásticas flexibles Etil vinil acetato (EVA) y Polietileno (PE) que poseen diferentes valores de permeabilidad a los gases y al vapor de agua; en ellas se envasaron 800g de semillas. Con el fin de regular la humedad dentro de los envases a algunos de ellos se les adicionó aserrín en relación 1:8 p/p. Luego de envasadas, las semillas fueron almacenadas en cámaras refrigeradas a 0, 4 y 10 °C. Las muestras fueron extraídas de cada condición de ensayo en forma bimestral. Las determinaciones de caracterización de las semillas se efectuaron en forma inicial y luego de cada período de almacenamiento. En los envases se determinó concentración de CO₂ (por GC) y pérdida de peso (por diferencia); en tanto que en las semillas se evaluó la capacidad germinativa (en arena humedecida a 27 °C durante 60 días), contenido de humedad (en estufa a 103 °C) y contenido de almidón (por HPLC). Los resultados mostraron que el

*Centro de Investigación y Desarrollo en Criotecnología de Alimentos (CIDCA) CONICET-Fac. Cs Exactas Univ. Nac. de La Plata-Pcia. de Bs. As.-Argentina. **EEA Montecarlo, INTA Pcia. de Misiones-Argentina.

porcentaje de CO₂ hallado, después de los primeros 7 meses de almacenamiento, fue mayor en los envases realizados con la película PE (a 4 y 10 °C). En cuanto a la pérdida de peso, se registró un aumento durante el almacenamiento, para todas las condiciones de ensayo; los mayores valores fueron registrados cuando se utilizó la película EVA y los envases fueron almacenados a 10°C. Los datos obtenidos de capacidad germinativa presentaron diferencias debido al empleo de las películas, tiempos y temperaturas de refrigeración ensayados. 0 °C permitió mantener los mayores valores de germinación. Durante el transcurso del almacenamiento se comprobó un aumento del contenido de humedad de las semillas de aproximadamente un 10%. El contenido de almidón mostró una disminución no significativa, si bien los mayores valores de pérdida se registraron en las semillas almacenadas a 10 °C. La adición de aserrín en los empaquetamientos no mostró diferencias significativas en el comportamiento de las semillas luego del almacenamiento refrigerado.

Palabras clave: Germinación, Temperatura, capacidad germinativa, *Araucaria Angustifolia*.

INFLUENCES OF TEMPERATURE AND COMPOSITION OF THE ATMOSPHERE IN CONSERVATION OF GERMINATIVE CAPACITY OF SEEDS OF *ARAUCARIA angustifolia* (bert.) o. stored *kuntze* FOR A LINGERING PERIOD.

Piriz Carrillo, V. *, Fassola, H. **, Chaves, A. * and Mugridge, A. *.

SUMMARY

The objective of the present work was to optimize a procedure that leads to enlarge the time of storage of seeds of *Araucaria angustifolia* (Bert.) O. Kuntze, without loss of germinative capacity, for a two year-old period, with the purpose of solving problems of typical cyclic time of this species and this way to be able to program both the culture and nursery in the field. For carrying out tests, seeds of *Araucaria angustifolia* which were from the area of natural distribution of the Manuel Belgrano Department were used, located in San Antonio's town, County of Misiones-Argentina. Bags were made with the flexible plastic Etil vinyl acetate (EVA) and Polyethylene (PE) covers that possess different permeability values to gases and vapor of water; 800 g of seeds were packed in the boxes. With the purpose of regulating the humidity inside the containers, to some of them were added sawdust in a proportion of 1:8 p/p. After having packed, the seeds were stored in refrigerated cammeras to 0, 4 and 10 °C. The samples were extracted of each test condition every two months. Determinations of characterization of seeds were made in an initial way and after every period of storage. In the containers, concentration of CO₂ was determined (for GC) and loss of weight (for difference); as long as in the seeds the germinative capacity was evaluated (in sand humidified to 27 °C during 60 days), content of humidity (in stove to 103 °C) and content of starch (for HPLC). Results showed that CO₂ percentage found after the first 7 months of storage, was higher in the containers made with the cover PE (to 4 and 10 °C). As for the loss of weight, an increase during the storage, for all the test conditions was registered; the highest values were registered when the EVA cover was used and the containers were stored at 10°C. The obtained data of germinative capacity presented differences due to the employment of the covers, times and tested refrigeration temperatures. 0 °C allowed to maintain the highest germination values. During the time of the storage an

increase of the content of humidity of the seeds of approximately 10% was verified. The content of starch showed a non - significant decrease, although the highest values of loss registered in the seeds stored 10 °C. The addition of sawdust in the packets did not show significant differences in the behavior of the seeds after refrigerated storage.

Key word: germination, temperature, germinative capacity, *Araucaria angustifolia*.

BIBLIOTECA

INTRODUCCIÓN

Las semillas de algunas especies forestales, especialmente de árboles tropicales y subtropicales, son consideradas como recalcitrantes (King and Roberts, 1979; Côme, 2000). Diversos autores (Côme, 2000; Roberts, 1973; Vazquez-Yañes, 1987) coinciden en describir a éstas semillas como generalmente grandes y carnosas con un alto contenido de humedad e incapaces de resistir desecación intensa sin pérdida de viabilidad. Las semillas de *Araucaria angustifolia* (Bert.) O. Kuntze se comportan como recalcitrantes.

Wang (1988) afirma que este tipo de semilla algunas veces no presenta dormancia, que tienen unas pocas semanas o meses de vida cuando son almacenadas y algunas son dañadas en el almacenamiento a bajas temperaturas. Côme (2000) sostiene que el almacenamiento de semillas recalcitrantes resulta muy dificultoso pues es indispensable mantenerlas en un ambiente húmedo (para evitar su desecación a pesar de los consiguientes riesgos de germinación y desarrollo de microorganismos) a una temperatura lo suficientemente baja para impedir la germinación o para reducir el desarrollo de plántulas, pero lo suficientemente cálida como para evitar daño por frío, pues las semillas recalcitrantes son sensibles a las bajas temperaturas.

Tompsett (1984) cita que cuatro especies del género *Araucaria* no pueden ser conservadas con contenidos de humedad por debajo del 25-40%. Específicamente para el caso de *Araucaria angustifolia* (Bert.) O. Kuntze el nivel crítico de humedad, por debajo del cual hay pérdida total de viabilidad, es aproximadamente del 38% (Eira et al. 1994). Esta característica imposibilita la conservación de las semillas por largo tiempo.

Se han realizado diversos estudios con el fin de poder encontrar algún método de conservación eficaz para semillas recalcitrantes. Existen antecedentes de conservación prolongada en semillas recalcitrantes procedentes de zonas templadas (Suszka y Tylkowski, 1980; Bonner, 1995). En Brasil, Prage (1964), logró conservar semillas de *Araucaria angustifolia* (Bert.) O. Kuntze manteniendo alto el poder germinativo durante cinco meses, utilizando bajas temperaturas (0-5°C) y envases de vidrio y polietileno para el almacenamiento. En Argentina, se conservaron semillas de *Araucaria angustifolia* (Bert.) O. Kuntze a 0°C empaquetadas con películas plásticas, manteniendo el poder germinativo durante 9 (Chaves, et. al. 1999) y 12 meses (Piriz Carrillo, et. al. 2000).

La aplicación de bajas temperaturas durante el tiempo de almacenamiento de los vegetales permite disminuir la velocidad de los procesos metabólicos. Además, el uso de bolsas plásticas flexibles para el envasado, evita la deshidratación y permite que en su interior se genere una atmósfera modificada que puede favorecer la conservación del producto; la composición de dicha atmósfera será función de la permeabilidad a los gases de la película empleada, del área disponible para el intercambio gaseoso, de la cantidad de producto envasado y de la actividad respiratoria del mismo (Day, 1990).

El objetivo del presente trabajo fue optimizar un procedimiento conducente a prolongar el tiempo de almacenamiento de semillas de *Araucaria angustifolia* (Bert.) O. Kuntze, sin pérdida de la capacidad germinativa, por un período de dos años, con el fin de paliar los problemas de ciclicidad típica de ésta especie y de ésta manera permitir programar la siembra, tanto en vivero como a campo.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material vegetal. Las semillas de *Araucaria angustifolia* (Bert.) O. Kuntze utilizadas, fueron recolectadas de los rodales implantados ubicados en el Campo Anexo Manuel Belgrano (EEA Montecarlo-INTA), localidad de San Antonio, Provincia de Misiones, Argentina y luego trasladadas por vía terrestre hasta los laboratorios del Centro de Investigación y Desarrollo en Criotecnología de Alimentos (CIDCA) (CONICET-Fac.Cs.Exactas, UNLP) ubicado en la ciudad de La Plata, provincia de Buenos Aires, Argentina.

La capacidad germinativa inicial fue evaluada en forma inmediata a la recolección (arrojando un valor del 35%) y luego de ser transportadas al laboratorio.

Acondicionamiento. Antes de ser empaquetadas, las semillas fueron sometidas a un tratamiento con una pasta de Captan PM : agua (2:1 p/v).

Luego, 800g de semillas (aproximadamente 120), muestreadas al azar, fueron colocadas en envases realizados con dos películas plásticas flexibles. A algunos envases, realizados con ambas películas, se les adicionó aserrín de pino en relación 8:1.

Las películas utilizadas fueron: *Etil vinil acetato* (EVA) y *Polietileno* (PE) cuyas características técnicas se muestran en el cuadro 1.

Cuadro 1: Características técnicas de las películas plásticas flexibles utilizadas para el empaquetamiento de semillas.

CARACTERÍSTICAS	PELÍCULAS	
	PE	EVA
Permeabilidad al O ₂ (cm ³ /m ² /24 hs/atm/23°C)	3.000	3.732
Permeabilidad al CO ₂ (cm ³ /m ² /24 hs/atm/23°C)	10.000	17.012
Transmisión al vapor de agua (gr/m ² /24 hs/%/HR/30°C)	7,2	16
Espesor (μ)	50	15

Condiciones de almacenamiento. Las semillas fueron almacenadas en cámaras reguladas a 0, 4, y 10 °C durante 24 meses.

DETERMINACIONES

Pérdida de peso. La pérdida de peso se determinó por diferencia entre el peso inicial de las bolsas conteniendo las semillas y el correspondiente a los obtenidos luego de los distintos períodos de almacenamiento refrigerado. Se empleó una balanza granataria con exactitud $\pm 0,1$ g. Los resultados se expresaron en g%.

Contenido de humedad. El contenido de humedad fue determinado sobre 10 semillas provenientes de cada condición de ensayo y se obtuvo por diferencia entre el peso de las mismas a la salida del almacenamiento refrigerado y el alcanzado luego de secadas en estufa a 103 °C hasta peso constante.

Contenido de almidón. La determinación del contenido de almidón presente en las semillas, se realizó por hidrólisis del endosperma con ácido clorhídrico 10% y se dosaron los azúcares resultantes por HPLC utilizando un cromatógrafo Waters equipado con un detector por índice de refracción. Se empleó una columna Accubon amino 5 μ y acetonitrilo-agua (75:15) como solvente de corrida.

Composición atmosférica. Periódicamente se determinaron las concentraciones de CO₂ correspondientes a las diferentes atmósferas desarrolladas dentro de los envases. La muestra gaseosa se tomó con una jeringa a través del film, tapándose inmediatamente la perforación con cinta adhesiva.

Se utilizó un cromatógrafo gaseoso Shimadzu con columna Alltech CTR1. Los resultados se expresaron en CO₂ (μ l %).

Semillas germinadas durante el almacenamiento. Luego de cumplidos los distintos tiempos de almacenamiento refrigerado se extrajeron, al azar, los envases realizados con las distintas películas conteniendo las semillas y se procedió al conteo de las que se hallaron germinadas; en base al total de semillas contenidas en cada empaquetamiento se determinó el porcentaje correspondiente. Asimismo, se observó el estado sanitario de las mismas.

Capacidad germinativa. Para la determinación de la capacidad germinativa se colocaron las muestras de semillas en bandejas plásticas con arena húmeda, en una cámara de germinación a 27 °C durante 60 días. Con el fin de evitar el desarrollo de hongos durante la germinación, los riegos periódicos se realizaron con una solución de Captan PM 20 g/10 l de agua. Se consideró como semilla germinada a aquellas con una emergencia radicular superior a 3 mm. Los resultados se expresaron en porcentaje de semillas germinadas.

Para la determinación de la capacidad germinativa inicial se colocó en la cámara de germinación una muestra de 40 semillas tomadas de a 10.

La capacidad germinativa de las muestras extraídas periódicamente del almacenamiento refrigerado se determinó sobre dos bandejas con 10 semillas cada una, colocadas en la cámara de germinación.

Para la determinación de la capacidad germinativa, luego de cada período de almacenamiento refrigerado se descartaron aquellas semillas que estaban germinadas en las bolsas, por haber considerado que se dañarían durante la sembra. Por ello, los datos informados para capacidad germinativa, se refieren a las semillas que no salieron germinadas de las distintas cámaras de almacenamiento refrigerado.

DISEÑO EXPERIMENTAL

Se utilizó un diseño factorial $2 \times 3 \times 12 \times 2$ donde los factores fueron película, temperatura y tiempo de almacenamiento refrigerado, usando dos repeticiones. Los datos fueron analizados mediante un ANOVA y las medias se compararon con el test LSD con un grado de significación $\alpha=0,05$.

Para los empaquetamientos conteniendo aserrín, el diseño utilizado fue $2 \times 3 \times 12 \times 2$.

RESULTADOS

Pérdida de peso. En la figura 1 se puede observar que, con el transcurso del tiempo de conservación y en todas las condiciones de ensayo, se registró un aumento en los valores de pérdida de peso.

A igualdad de temperatura de almacenamiento, las semillas empaquetadas con la película EVA, registraron valores de pérdida de peso ligeramente superiores, especialmente a partir de los 16 meses de almacenamiento a $10\text{ }^{\circ}\text{C}$.

A lo largo del almacenamiento e independientemente de la película utilizada para los empaquetamientos- los menores valores de pérdida de peso fueron hallados en las semillas almacenadas a $0\text{ }^{\circ}\text{C}$ (no superó el 2%) y los mayores se registraron a $10\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Los empaquetamientos conteniendo aserrín presentaron un comportamiento similar.

Contenido de humedad. Al iniciar las experiencias, el contenido de humedad de las semillas fue del 44.6%. El mismo, aumentó durante los primeros 12 meses de experiencia, para luego mantenerse prácticamente constante hasta el final del almacenamiento, independientemente de la película empleada, la temperatura de conservación (fig. 2) y la presencia de aserrín en los empaquetamientos.

Contenido de almidón. Al analizar los datos obtenidos en función del tiempo de almacenamiento, se observó que las diferencias halladas no fueron significativas ($P < 0.05$) para las distintas películas, temperaturas empleadas y adición de aserrín. Sin embargo, el contenido de almidón inicial (72,9%) disminuyó a partir de los 2 meses, hasta llegar a valores cercanos al 40% al final del almacenamiento, especialmente en las semillas empaquetadas con la película EVA y conservadas a 4 y 10°C.

Composición atmosférica. Se hallaron diferencias significativas respecto al uso de las dos películas ensayadas para realizar los envases; los mayores valores de CO₂ fueron registrados en los empaquetamientos realizados con la película PE. En la figura 3 se puede observar el incremento en el porcentaje de CO₂ registrado a partir de los 7 meses de almacenamiento, especialmente para las bolsas almacenadas a 4 y 10 °C.

Los menores valores de concentración de CO₂ se hallaron en los empaquetamientos realizados con la película EVA y conservados a 0 °C.

No se observó diferencias importantes de comportamiento con los empaquetamientos conteniendo aserrín.

Semillas germinadas durante el almacenamiento. A partir de los 2 meses de almacenamiento refrigerado se observó, a 4 y 10 °C, germinación de semillas dentro de algunos envases (con distintos grados de evolución). En la figura 4 se puede observar que, el porcentaje de germinación aumentó notoriamente a lo largo del tiempo de almacenamiento, independientemente de la película utilizada. En los empaquetamientos almacenados a 0°C no se observó germinación dentro de los envases.

A igualdad de temperatura y tiempos de almacenamiento, los porcentajes de germinación en las semillas empaquetadas con las películas PE y EVA, no

difirieron significativamente, si bien existió una tendencia a encontrar valores mayores en los empaquetamientos realizados con la película PE.

No se encontró diferencias de comportamiento en los empaquetamientos donde se adicionó aserrín.

Capacidad germinativa. El porcentaje de germinación inicial, registrado en forma inmediata al arribo de las semillas al CIDCA, fue del 35%.

En la figura 5 se puede observar la variación de los porcentajes promedios de germinación, obtenidos para las distintas películas, temperaturas y tiempos de almacenamiento ensayados.

Fue posible observar, en todas las condiciones de ensayo, que a partir de los 2 meses de almacenamiento refrigerado, se incrementó la capacidad germinativa, llegando a su valor máximo entre los 4 y 6 meses con valores entre 80 y 95%. A los 8 meses la capacidad germinativa descendió a valores aproximados al inicial.

Luego de los 8 meses se pudo observar que, para las semillas conservadas a 4 y 10 °C, independientemente de la película empleada, la capacidad germinativa continuó descendiendo hasta el final de almacenamiento, momento en el cual el valor de la misma fue cero. Mientras que, las semillas almacenadas a 0 °C volvieron a tener un notorio aumento del porcentaje de germinación entre los 12 y 20 meses, llegando a valores similares a los determinados para los 4-6 meses de ensayo. A los 24 meses, las semillas almacenadas a 0 °C tuvieron una capacidad germinativa de aproximadamente 40%.

En los empaquetamientos almacenados a 4 y 10 °C, hacia el final del período de refrigeración, se observó presencia de hongos.

En general, no se encontraron diferencias entre los resultados registrados en las experiencias realizadas con semillas almacenadas con y sin aserrín (fig. 6). Cabe destacar que se observó, en todos los casos, una mayor velocidad de germinación y en algunas muestras mayor vigor de las plántulas de las semillas almacenadas en presencia de aserrín con respecto a las semillas que se conservaron sin aserrín.

CONCLUSIONES

Este trabajo sugiere que 0 °C y el uso de la película EVA es apropiado para el almacenamiento de semillas por un período de 2 años.

Bajo éstas condiciones de almacenamiento no se observó germinación en cámara y la capacidad germinativa se conservó durante 24 meses con un porcentaje de germinación similar al inicial.

La adición de aserrín en los empaquetamientos, no influyó mayormente en el comportamiento de las semillas, luego del almacenamiento refrigerado.

AGRADECIMIENTOS

- Lic. Alejandro Gorretta, por su colaboración en determinaciones de laboratorio.
- Dra. García Alejandra, por su colaboración en la determinación de permeabilidad de las películas plásticas.
- Proyecto Forestal de Desarrollo (Secretaría de Agricultura, Ganadería, Pesca y Alimentación), por el financiamiento otorgado para la realización del trabajo.

BIBLIOGRAFÍA

1. Bonner, F. T. (1995). Storage of temperate recalcitrant forest tree seeds. Innovations in Tropical Tree Seed Technology. IUFRO Symposium. Arusha, Tanzania, 30-36.
2. Côme, D. (2000). Storage of seeds. International Institute of Refrigeration. Conference Murcia Spain. 51.
3. Chaves, A., Mugridge, A., Fassola, H., Alegranza, D., Fernandez, R. (1999). Conservación refrigerada de semillas de *Araucaria angustifolia* (Bert.) O. Kuntze. [Refrigeration storage of *Araucaria angustifolia* (Bert.) O. Kuntze seeds]. Bosque, 20, 2 117-124.
4. Day, B.P.F. (1990). "A perspective of modified atmosphere packaging of fresh produce in Western Europe", Food Science and Technology Today. 4(4): 215-221.
5. Eira, M. T. S., Salomao, A. N., Da Cunha, R., Carrara, D. K. and Mello, C. M. C. (1994). Efeito de teor de agua sobre a germinação de sementes de *Araucaria angustifolia* (Bert.) O. Kuntze-Araucariaceae. [Effect of moisture content on the germination of *Araucaria angustifolia* (Bert.) O. Kuntze seeds]. Revista Brasileira de Sementes, 16, 1 71-75.
6. King, M. W. and Roberts, E. H. (1979). The storage of recalcitrant seed-achievements and possible approaches. International Board for Plant Genetic Resources. 1-96, Rome.
7. Piriz Carrillo, V.; Fassola, H.; Chaves, A. y Mugridge, A. (2000). Empleo de bajas temperaturas en la conservación de semillas de *Araucaria angustifolia* (Bert.) O. Kuntze. Memorias del II Simposio sobre Avances en la Producción de Semillas Forestales en América Latina. 215-218.
8. Prage, P. W. (1964). Estudo de conservacao do poder germinativo de sementes de *A. angustifolia* (Bert) O. Kuntze. [Conservation study on the germination power of *A. angustifolia* (Bert) O. Kuntze seeds]. Anuario Brasileiro de Economia Forestal, 16, 43-53.
9. Roberts, E.H. (1973). Predicting the storage life of seeds. Seed Science and Technology, 1, 499-514.
10. Suszka, R. and Tylkowski, T. (1980). Storage of acorns of the English oak (*Quercus robur* L.) over 1-5 winters. Arboretum Kronickie. Rocznik XXV.
11. Tompsett, P.B. (1984). Desiccation studies in relation to the storage of *Araucaria* seed. Annals applied Biology, 105, 587-589.
12. Vazques-Yañes, C. (1987). El almacenamiento de semillas en la conservación de especies forestales. [Conservation the storage seeds of forest species] Ciencia, 38, 239-246.
13. Wang, B. S. P. (1988). Review of vew developments in tree seeds. Seed Science and Technology, 16, 215-225.

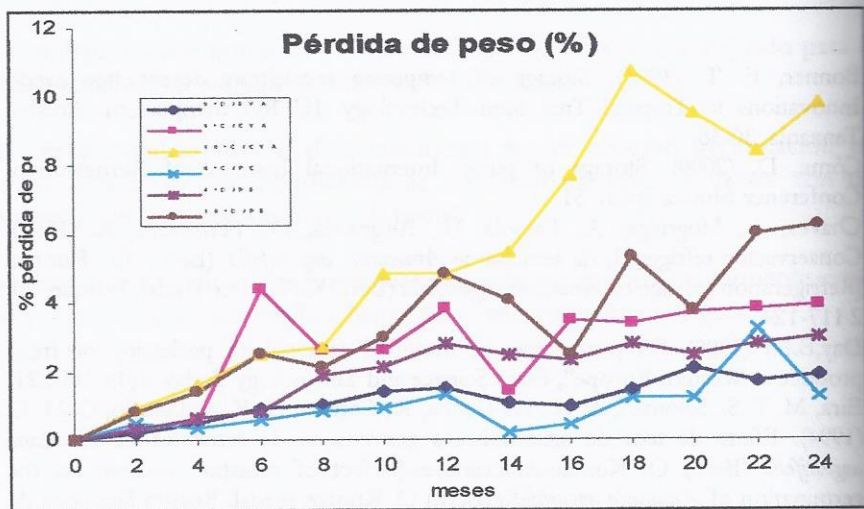


Figura 1

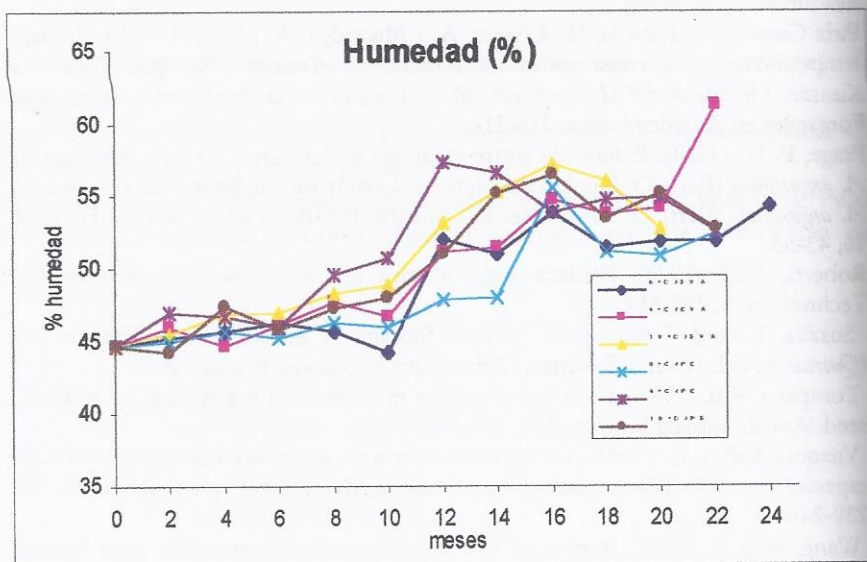


Figura 2

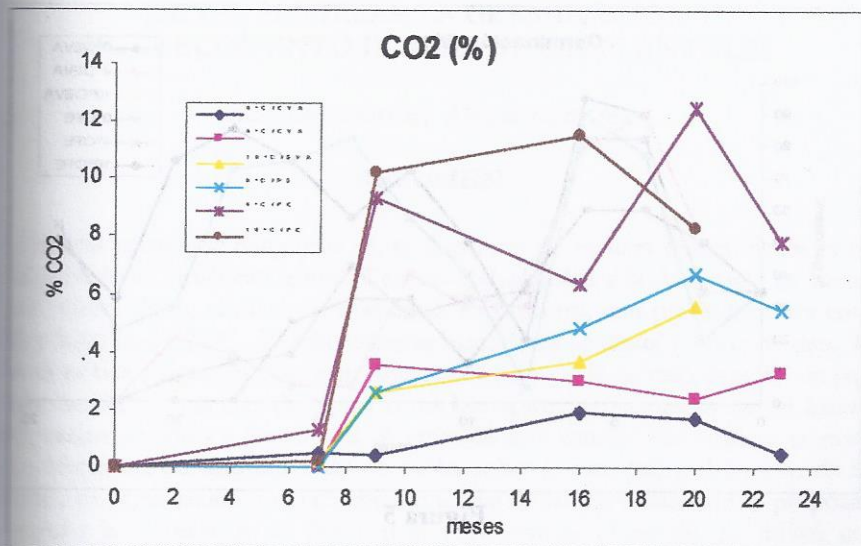


Figura 3

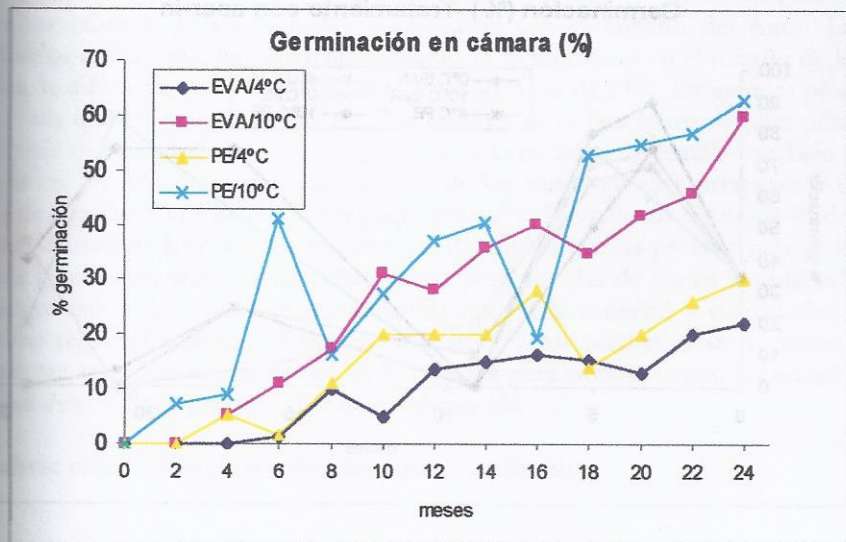


Figura 4

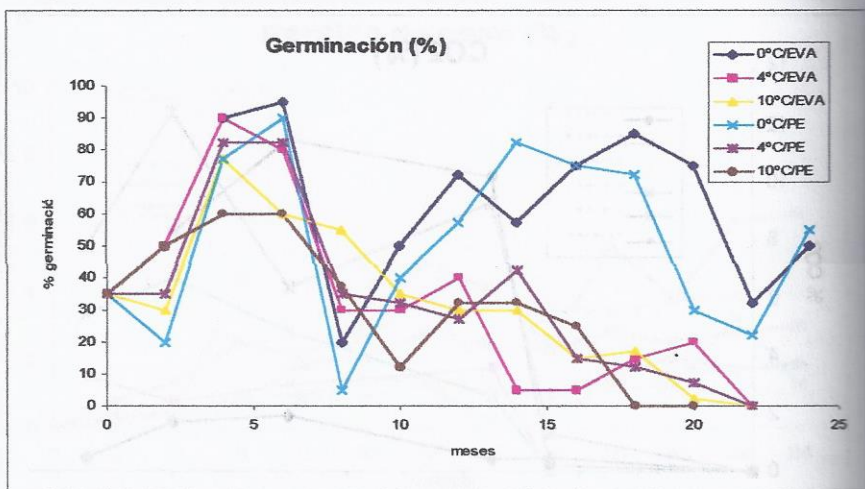


Figura 5

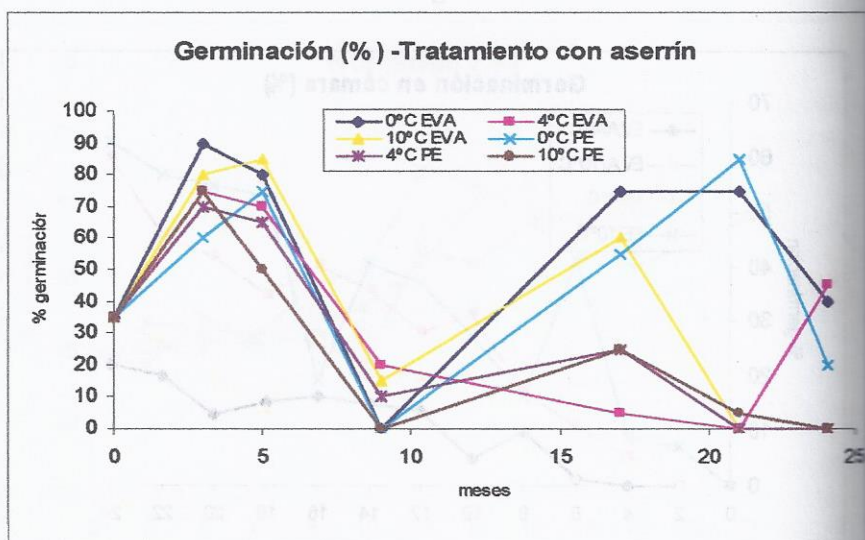


Figura 6