

CONSERVACIÓN POR REFRIGERACIÓN DE SEMILLAS DE *ARAUCARIA ANGUSTIFOLIA* (BERT.) O. KUNTZE

REFRIGERATED CONSERVATION OF *ARAUCARIA ANGUSTIFOLIA* (BERT.) O. KUNTZE SEEDS

Verónica Piriz Carrillo¹
Alejandro G. Gorretta¹
Alicia R. Chaves¹
Alicia Mugridge¹
Hugo E. Fassola²

1Centro de Investigación y Desarrollo en Criotecnología de Alimentos (CIDCA)
nigvpc@tucbbs.com.ar; gorretta@yahoo.com ; arch@dalton.quimica.unlp.edu.ar;
amugridg@quimica.unlp.edu.ar

CONICET-Fac. Cs Exactas Univ. Nac. de La Plata

2 Ing. Ftal. MBA. INTA EEA Montecarlo. hfasola@ceel.com.ar

SUMMARY

The objective of this work was to extend the time of storage of *Araucaria angustifolia* (Bert.) O. Kuntze seeds, without losing germination ability. This fact could enable to programme the moment of the seeding both in tree nursery or at field, overcoming the cyclic behaviour of this specie. Seeds from the Department Manuel Belgrano, (Misiones, Argentina) were used. They were packaged in flexible plastic bags (Ethyl Vinyl Acetate -EVA- and Polyethylene -PE-) and they were kept at -3, 0, 4 and 10°C. To regulate moisture inside the bags, sawdust (1:8 w/w) was added to some of them. Samples were taken on a bimonthly basis. The CO₂ concentration inside the packages was measured by GC. Weight losses were evaluated by weighing the bags at the beginning and ending of the storage period. Germination capacity of the seeds (27°C), moisture (oven method at 103°C) and starch content (by HPLC) were evaluated. Czabator's Germination Index and Maguire's Germination Speed were calculated. CO₂ concentration inside the bags increased from the 7th month of storage, and the highest weight loss was found at 10°C. Germination capacity was best kept during storage at 0°C and in bags made of EVA. Concerning moisture content, an increase of about 10% was verified during the storage period. The starch content showed a light decrease. Sawdust addition did not lead to any significant differences in the behaviour of the seeds. The results suggested that a temperature of 0°C and the use of EVA film were the appropriated conditions to store *Araucaria angustifolia* (Bert.) O. Kuntze seeds for a 2-years period, keeping a good germination capacity.

Key words: storage of seeds, controlled atmosphere, *Araucaria angustifolia* Bert O. Kuntze

RESUMEN

El objetivo de este 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 para facilitar la programación de la siembra, tanto en

*Proyecto parcialmente financiado por el Convenio SAGPYA-BIRF 3948. PIA 26/97.

Décimas Jornadas Técnicas Forestales y Ambientales. -Facultad de Ciencias Forestales-UNaM- EEA MontecarloINTA - Eldorado, Misiones, Argentina

vivero como a campo y de ésta manera paliar los inconvenientes causados por la ciclicidad típica de ésta especie. Para la realización de los ensayos se utilizaron semillas provenientes del Departamento Manuel Belgrano, (Misiones, Argentina). Las mismas se envasaron en bolsas realizadas con películas plásticas flexibles (Etil vinil acetato y Polietileno) y almacenaron en cámaras refrigeradas a -3, 0, 4 y 10°C. A algunos envases se les adicionó aserrín (1:8 p/p). Las muestras se extrajeron bimestralmente. En los envases se determinó concentración de CO₂ (por GC) y pérdida de peso (por diferencia); en tanto que en las semillas se evaluó capacidad germinativa (a 27°C), contenido de humedad (a 103°C) y contenido de almidón (por HPLC). Se calculó el Valor de germinación de Czabator y la Velocidad de germinación de Maguire. La concentración de CO₂ desarrollada en los envases aumentó a partir del séptimo mes de almacenamiento y la mayor pérdida de peso se registró a 10°C. Los mayores valores de germinación se obtuvieron en las semillas de las bolsas realizadas con la EVA y almacenadas a 0°C. Durante el almacenamiento, las semillas registraron un aumento del contenido de humedad (10%) y una ligera disminución del contenido de almidón. La adición de aserrín no mostró diferencias significativas. Los resultados obtenidos sugieren que el almacenamiento a 0°C y el uso de la película EVA son apropiados para el almacenamiento de semillas por un período de 2 años.

Palabras clave: conservación de semillas, atmósfera controlada, *Araucaria angustifolia* Bert O. Kuntze

INTRODUCCIÓN

Diversos autores (CÔME, 2000; KING *et al.*, 1979; ROBERTS, 1973; VAZQUEZ-YAÑES, 1987) coinciden en describir a las semillas recalcitrantes de algunas especies forestales como generalmente grandes y carnosas con un alto contenido de humedad e incapaces de resistir desecación intensa sin pérdida de viabilidad.

Côme (2000) sostiene que el almacenamiento de este tipo de semillas resulta muy difícil porque 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. Wang (1988) afirma que cuando este tipo de semilla son almacenadas, tienen unas pocas semanas o meses de vida.

Para el caso de *Araucaria angustifolia* (Bert.) O. Kuntze, Eira *et al.* (1994) cita que el nivel crítico de humedad, por debajo del cual hay pérdida total de viabilidad, es aproximadamente del 38%. Esta característica imposibilita la conservación de las semillas por largo tiempo.

Existen antecedentes de conservación prolongada en semillas recalcitrantes procedentes de zonas templadas. En Argentina, se conservaron semillas de *Araucaria angustifolia* a 0°C empaquetadas con películas plásticas, manteniendo el poder germinativo durante 9 (CHAVES, *et al.* 1999) 12 (PIRIZ CARRILLO, *et al.* 2000) y 24 meses (PIRIZ CARRILLO, *et al.* 2001).

La utilización de bajas temperaturas durante el almacenamiento de los vegetales permite disminuir la velocidad de los procesos metabólicos. Además, el uso de películas plásticas flexibles para el envasado, evita la deshidratación y permite que en el interior se genere una atmósfera modificada que puede favorecer la conservación del producto. El objetivo de este

trabajo fue establecer las condiciones de almacenamiento refrigerado que mejor se adecuen para conservar el poder germinativo de las semillas de *Araucaria angustifolia* (Bert.) O. Kuntze por un período de dos años.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material vegetal: las semillas de *Araucaria angustifolia* (Bert.) O. Kuntze, fueron recolectadas de rodales implantados ubicados en el Campo Anexo Manuel Belgrano (EEA Montecarlo-INTA), (San Antonio, Misiones, Argentina) y luego trasladadas hasta los laboratorios del CIDCA (CONICET-Fac.Cs.Exactas, UNLP) ubicado en la ciudad de La Plata (Buenos Aires, Argentina).

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

800g de semillas (aprox. 120), fueron colocados en envases realizados con las películas plásticas flexibles *Etil vinil acetato* (EVA) y *Polietileno* (PE) cuyas características técnicas se muestran en el cuadro 1. A algunos envases, se les adicionó aserrín de pino en relación 8:1.

Cuadro 1: Características técnicas de las películas plásticas flexibles utilizadas.

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

Almacenamiento: las semillas fueron almacenadas en cámaras reguladas a -3, 0, 4, y 10°C durante 24 meses.

Muestreo: las muestras fueron extraídas de cada condición de ensayo bimestralmente, al azar, y se procedió a realizar las determinaciones que se detallan a continuación.

Determinaciones

Composición atmosférica: la extracción de la muestra gaseosa de las atmósferas desarrolladas dentro de los envases se realizó con una jeringa a través del film. Se utilizó un cromatógrafo gaseoso Shimadzu con columna Alltech CTR1. Los resultados se expresaron en CO₂ (μl %).

Pérdida de peso: se calculó por diferencia entre el peso inicial de las bolsas conteniendo las semillas y el obtenido luego de los distintos períodos de almacenamiento refrigerado. Se empleó una balanza granataria con exactitud ± 0,1 g. Los resultados se expresaron en g%.

Semillas brotadas durante el almacenamiento: se contaron las semillas brotadas dentro de cada envase y luego se expresó como porcentaje sobre el total.

Capacidad germinativa: las muestras de semillas se colocaron en bandejas con arena húmeda, en una cámara de germinación a 27°C durante 60 días. La capacidad germinativa inicial se determinó sobre una muestra de 40 semillas tomadas de a 10 y la de las extraídas periódicamente del almacenamiento refrigerado sobre dos bandejas con 10 semillas cada una. Se consideró como semilla germinada a aquella cuya emergencia radicular superara los 3 mm. Los riegos periódicos se realizaron con fungicida (Captan PM 20 g/10 l de agua). Los resultados se expresaron en porcentaje.

Los datos informados se refieren a las semillas que no salieron brotadas del almacenamiento refrigerado; pese a que de ésta manera se subestime el poder germinativo general, no sería conveniente utilizarlas porque aumentaría el descarte (es posible que la raíz se encuentre deshidratada y además resultaría fácil que se rompa durante la siembra).

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: 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 5µ y acetonitrilo-agua (75:15) como solvente de corrida.

Vigor: para predecir el posible comportamiento de las semillas al momento de la siembra a campo se calculó, a partir de los 18 meses de almacenamiento refrigerado, el Valor de Germinación de Czabator (1962) (VGC: producto entre el porcentaje máximo de germinación acumulada y el promedio de la germinación diaria) y la Velocidad de Germinación de Maguire (1962) (VG: producto de la división entre el número de semillas germinadas y los días que demandó la emergencia). Ambos índices fueron calculados con los datos obtenidos del conteo diario de las semillas germinadas.

Diseño experimental: se utilizó un diseño factorial 2 x 3 x 12 x 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 x 3 x 6 x 2.

RESULTADOS

Composición atmosférica: se hallaron diferencias significativas respecto al uso de las dos películas ensayadas para realizar los envases. A partir de los 7 meses de almacenamiento se pudo observar un incremento en el porcentaje de CO₂ especialmente en los empaquetamientos realizados con la película PE y almacenados a 4 y 10°C (aprox. 11%).

Las menores concentraciones de CO₂ registradas durante el almacenamiento fueron las correspondientes a los empaquetamientos realizados con la película EVA y conservados a 0°C (aprox. 1.7% a partir del mes 10).

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

Pérdida de peso: en la figura 1 puede observarse 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. No se hallaron diferencias significativas ($P<0,05$) en los empaquetamientos realizados con las distintas películas ensayadas, durante todo el tiempo de almacenamiento.

Independientemente de la película utilizada, los menores valores de pérdida de peso fueron hallados en las semillas almacenadas a 0°C (no superó el 2%) y los mayores se registraron a 10°C (a partir de los 18 meses alcanzaron valores cercanos al 8%).

Los empaquetamientos conteniendo aserrín presentaron un comportamiento similar.

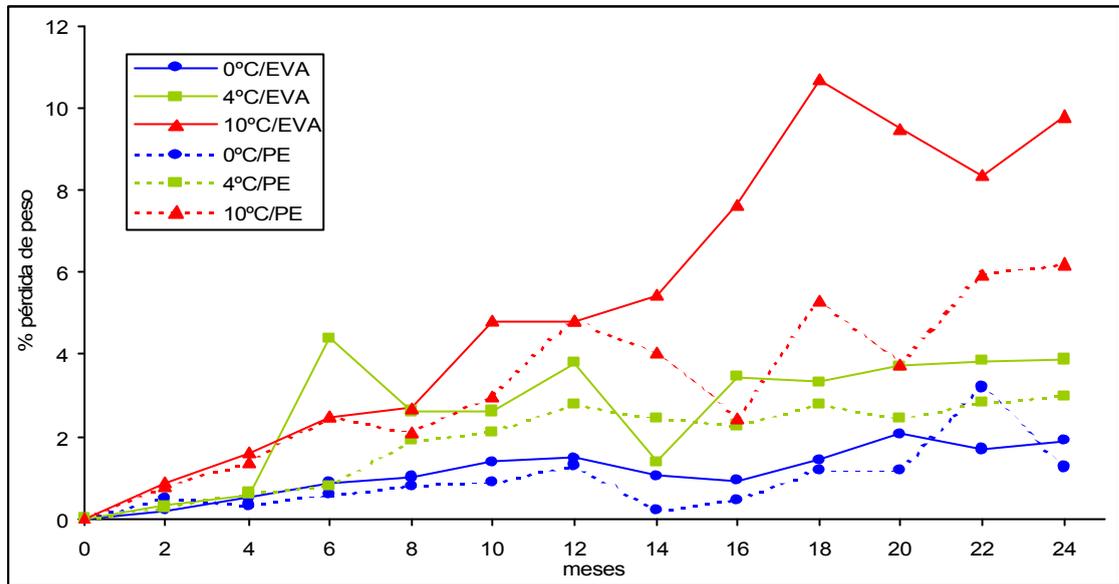


Figura 1: pérdida de peso (%) en función de la película de envase, temperatura y tiempo de almacenamiento

Capacidad germinativa: la capacidad germinativa inicial fue del 35% (evaluada en forma inmediata a la recolección y luego de ser transportadas al CIDCA).

En la figura 2 se puede observar la variación de los porcentajes promedios de germinación, obtenidos para las distintas películas, temperaturas y tiempos de almacenamiento ensayados.

En todas las condiciones de ensayo fue posible observar, especialmente entre los 4 y 6 meses de almacenamiento refrigerado, un poder germinativo superior al inicial (llegó a valores del 95% para las semillas empaquetadas con la película EVA, almacenadas a 0°C). Aquila, A. y otro (1984) han citado que puede ocurrir una dormancia inicial, poco pronunciada, que el almacenamiento a corto plazo, hace desaparecer. Luego de alcanzar los valores máximos de poder germinativo, con el transcurso del tiempo de almacenamiento, comienzan a descender; éste descenso continúa hasta el final del almacenamiento para las semillas conservadas a 4 y 10°C, mientras que, las refrigeradas a 0°C volvieron a tener un notorio aumento del porcentaje de germinación (entre los 12 y 20 meses). Las semillas almacenadas a -3°C sufrieron daños, con pérdida total de germinación

Probablemente debido a la presencia de hongos dentro de los envases, la germinación a 4 y 10°C llegó a 0% a los 22 meses, en tanto que a 0°C se mantuvieron valores superiores a los iniciales para ambas películas.

En todas las condiciones de ensayo, respecto al empleo de las distintas películas de empaquetamiento, no se hallaron diferencias significativas en los porcentajes de germinación ($P < 0.05$). Sin embargo, hacia el final del almacenamiento, se pudo observar porcentajes ligeramente superiores en las semillas empaquetadas con la película EVA, cuando fueron conservadas a 0°C.

No se encontraron, en general, diferencias entre los resultados registrados en las

experiencias realizadas con semillas almacenadas con y sin aserrín.

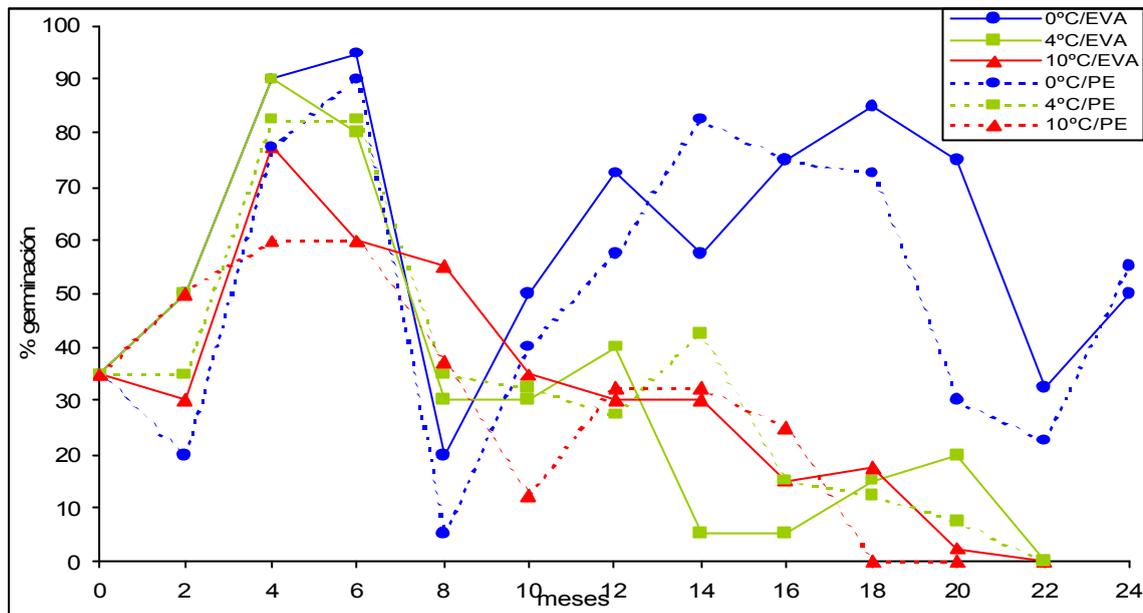


Figura 2: germinación (%) en función de la película de envase, temperaturas y tiempos de almacenamiento

Semillas brotadas durante el almacenamiento: a partir de los 2 meses de almacenamiento refrigerado se observó, a 4 y 10°C, brotación de semillas dentro de algunos envases. En los empaquetamientos almacenados a 0°C no se registró brotación.

El porcentaje de semillas brotadas aumentó notoriamente a lo largo del tiempo de almacenamiento, independientemente de la película utilizada.

A igualdad de temperatura y tiempos de almacenamiento, los porcentajes de brotación en las semillas empaquetadas con las películas PE y EVA, no difirieron significativamente, si bien existió una tendencia a encontrar valores mayores en los envases realizados con la película PE.

En la foto 1 se pueden observar los distintos grados de brotación de semillas empaquetadas con la película EVA luego de 12 meses de almacenamiento refrigerado a 0, 4 y 10 °C.

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

Contenido de humedad: al iniciar las experiencias, el contenido de humedad de las semillas fue del 44.6%. Probablemente como consecuencia de la actividad respiratoria de las mismas, hubo un aumento de la humedad (10% promedio) durante los primeros 12 meses, para luego mantenerse prácticamente constante (no se presentaron diferencias significativas en función de película, temperatura y presencia de aserrín). Tompsett, P.B. (1982) cita éste fenómeno para semillas de otra especie de Araucaria, almacenadas en bolsas de polietileno.



Foto 1: Estado de la semilla de *Araucaria angustifolia* tras 12 meses de conservación en envases EVA a distintas temperaturas

Contenido de almidón: el contenido inicial de almidón fue del 72,9%. A partir de los 2 meses de almacenamiento refrigerado se registró una disminución en todas las condiciones de ensayo; los menores valores (aprox. 40%) se hallaron en las semillas empaquetadas con la película EVA y almacenadas a 4 y 10°C. 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.

Vigor: los valores de VGC y VG mostraron que el almacenamiento a 0°C, independientemente de los demás factores estudiados, ha influido positivamente sobre la velocidad de germinación.

CONCLUSIONES

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

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

AGRADECIMIENTO

Al Proyecto Forestal de Desarrollo (Secretaría de Agricultura, Ganadería, Pesca y Alimentación), por el financiamiento otorgado para la realización del trabajo.

BIBLIOGRAFÍA

- AQUILA, M.E.A. e Ferreira A.G. (1984). Germinação de sementes escarificadas de *Araucaria angustifolia* em solo. *Ciencia e Cultura*, 36 (9) 1583-1589.
- CÔME, D. (2000). Storage of seeds. International Institute of Refrigeration. Conference Murcia Spain. 51.
- 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.

- CZABATOR, F.J. (1962) Germination value: An index combining speed and completeness of Pine seed germination. *Forest Science*, vol 8 n° 4.
- 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.
- KING, M.W. and Roberts, E.H. (1979). The storage of recalcitrant seed achievements and possible approaches. International Board for Plant Genetic Resources. 196, Rome.
- MAGUIRE, J.D. (1962) Seed of germination aid in selection and evaluation for seedling emergence and vigor. *Crop Science*, 2: 176-177.
- 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.
- PIRIZ CARRILLO, V.; Fassola, H.; Chaves, A. y Mugridge, A. (2001). 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. *Revista Forestal Latinoamericana*. 16 (30) 163-178.
- ROBERTS, E.H. (1973). Predicting the storage life of seeds. *Seed Science and Technology*, 1: 499-514.
- TOMPSETT, P.B. (1982). The effect of desiccation on the longevity of seeds of *Araucaria hunsteinii* and *A. cunninghamii*. *Annals of Botany*, 50: 693-704.
- 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.
- WANG, B.S.P. (1988). Review of new developments in tree seeds. *Seed Science and Technology*, 16: 215-225.