



5º CONGRESO FORESTAL
ESPAÑOL

5º Congreso Forestal Español

Montes y sociedad: Saber qué hacer.

REF.: 5CFE01-254

Editores: S.E.C.F. - Junta de Castilla y León
Ávila, 21 a 25 de septiembre de 2009
ISBN: 978-84-936854-6-1
© Sociedad Española de Ciencias Forestales

Germinación de *Pinus pinaster* bajo condiciones de sequía y bajas temperaturas

NUÑEZ PANIAGUA, M.R.^{1,2}, PANDO, V.^{1,3}, SIERRA DE GRADO, R.^{1,2}, BRAVO, F.^{1,2}

¹ Instituto de Gestión Forestal Sostenible, Universidad de Valladolid-INIA

² Departamento de Producción Vegetal y Recursos Forestales. Escuela Técnica Superior de Ingenierías Agrarias. Avda. de Valladolid s/n, CP: 34004, Palencia. Universidad de Valladolid.

³ Departamento de Estadística e Investigación Operativa. Escuela Técnica Superior de Ingenierías Agrarias. Avda. de Valladolid s/n, CP: 34004, Palencia. Universidad de Valladolid.

Resumen

La tasa y el patrón de germinación del pino negral (*Pinus pinaster* Ait.) se estudió bajo diferentes condiciones de estrés hídrico y de frío. Se utilizaron semillas de cuatro procedencias de pino negral (Sierra de Gredos, Noroeste costera, Serranía de Cuenca y Levante) representativas de diferentes condiciones ecológicas. Se ensayaron factorialmente, durante 48 días, cuatro niveles de potencial hídrico (0, -4, -6 y -8 bares) alcanzado mediante diferentes concentraciones de Polietilenglicol 6000 y tres condiciones diferentes de temperatura. Las condiciones de temperaturas ensayadas fueron las siguientes: F1 (20 °C durante una semana, 4°C durante un día y 20 °C durante el resto del experimento), F2 (20 °C durante una semana, 4°C durante un día, 0°C durante un día, de nuevo 4°C durante un día y 20 °C durante el resto del experimento), y F3 (20 °C durante todo el experimento). Solo los efectos del estrés hídrico y de la procedencia y la interacción triple entre el estrés hídrico, el frío y la procedencia resultaron significativos. La región de procedencia que mejor resistió el estrés hídrico son las levantinas (Cuenca y Levante). En todos los tratamientos la procedencia Noroeste costera presentó menores tasas de germinación y aunque esto puede ser achacado a condiciones endógenas de la semillas los contrastes individuales mostraron que es la procedencia más sensible al estrés hídrico. El estrés hídrico redujo el porcentaje de germinación desde un 90,17 % (situación control, $\psi = 0$ bares) hasta el 72,17 % en el caso del estrés hídrico más severo ($\psi = -8$ bares) Mediante el test de diferencias de medias se separan los tratamientos de estrés hídrico control ($\psi = 0$ bares), el tratamiento $\psi = -4$ bares y el resto de tratamientos ($\psi = -6$ y $\psi = -8$ bares) que no presentan diferencias entre ellos. La interacción triple ensayada (procedencia, frío y estrés hídrico) resultó significativa ya que la respuesta a la sequía de cada una de las procedencias fue modulada por el régimen térmico.

Palabras clave

frío, germinación, semilla, sequía, *Pinus pinaster*,

1. Introducción

El cambio climático es posiblemente la mayor amenaza para el mantenimiento de los bosques en el mundo así como para que sigan proveyendo de forma sostenible de servicios y bienes. Los bosques pueden jugar un papel relevante en la mitigación del cambio climático, fundamentalmente a través de actividades selvícolas orientadas a la promoción del secuestro del CO₂ lo que ha llevado a que las investigaciones ecológicas se centren en los balances de carbono de estos ecosistemas (IPCC 2000, 2001, 2007) y en su potencial impacto sobre el

cambio climático. Sin embargo, los problemas de adaptación al cambio climático de los bosques y de las técnicas selvícolas no han sido adecuadamente estudiados.

Pinus pinaster Ait. es una de las principales especies forestales circunmediterráneas tanto por la superficie que ocupa como por su interés para la producción de madera, resina y otros productos no maderables y su interés ecológico. En los países ribereños del mar Mediterráneo ocupa aproximadamente 4 millones de hectáreas (Ribeiro et al, 2001) con condiciones ecológicas muy dispares. Debido a la importancia de la especie se han desarrollado durante las últimas décadas numerosos trabajos centrados en aspectos genéticos, fisiológicos, morfológicos, productivos, de respuesta a las variaciones climáticas tanto del crecimiento como de la susceptibilidad a plagas forestales, ecológicos, de la producción micológica, dasocráticos o selvícolas. Sin embargo no han sido estudiados, de forma simultánea, los efectos sobre la germinación de los dos factores fundamentales ligados al cambio climático: la sequía y la variación de la temperatura.

2. Objetivos

El principal objetivo de este trabajo es evaluar la respuesta de la germinación de cuatro procedencias representativas de los pinares de *Pinus pinaster* a diferentes condiciones de estrés hídrico y de temperatura.

3. Metodología

Procedencias estudiadas

Se han estudiado cuatro procedencias españolas de *Pinus pinaster* Ait. de forma que se cubrió un amplio rango de las condiciones de estación ocupadas por la especie. Las cuatro procedencias estudiadas son: Noroeste costera (en adelante NoroesteI, Sierra de Gredos (en adelante Gredos), Serranía de Cuenca (en adelante Cuenca) y Levante (Alía et al, 1996), de forma que se ha podido contrastar procedencias de zonas secas y húmedas y de zonas frías y templadas. Las semillas fueron obtenidas de la Dirección General de la Biodiversidad del Ministerio de Medio Ambiente y conservadas en bolsas de papel en cámara fría hasta que se desarrolló el experimento. Las condiciones ecológicas de las cuatro procedencias estudiadas (tabla 1) representan condiciones muy dispares en concordancia con la amplia y heterogénea, desde un punto de vista ambiental, distribución de la especie.

Región de procedencia	Altitud (m)	Temperaturas (°C)	Precipitación anual (mm)	Precipitación estival (mm)
Noroeste costera	200-400	14,7-11,2	2078-866	58-15
Sierra de Gredos	800-1400	15,1-12,2	1664-1007	17,3-6
Serranía de Cuenca	800-1200	15,5-9,4	1005-455	34-11
Levante	800-1000	15,7-14,6	516-409	15-5

Tabla 1. Rangos de condiciones ambientales representativas de las regiones de procedencias estudiadas

Procedimientos de laboratorio

Las semillas de las cuatro procedencias fueron sometidas a diferentes concentraciones de Polietilenglicol 6000 polvo PS de la marca PANREAC 163325 para obtener diferentes

condiciones de estrés hídrico. Se siguió la metodología propuesta por Michel y Kaufmann (1973) y modificada por Michel (1983) de acuerdo con la siguiente expresión:

$$[\text{Ec 1}] \quad [PEG] = \frac{4 - \sqrt{5,16\psi/T - 560\psi + 16}}{2,58T - 280}$$

Donde,

[PEG]: gramos de Polietilenglicol 6000 por cada gramo de agua

ψ : Potencial hídrico en bares

T: Temperatura en grados Celsius

Se ensayaron factorialmente cuatro niveles de potencial hídrico (0, -4, -6 y -8 bares) y tres condiciones diferentes de temperatura. Las condiciones de temperaturas ensayadas fueron las siguientes: F1 (20 °C durante una semana, 4°C durante un día y 20 °C durante el resto del experimento), F2 (20 °C durante una semana, 4°C durante un día, 0°C durante un día, de nuevo 4°C durante un día y 20 °C durante el resto del experimento), y F3 (20 grados centígrados durante todo el experimento). La combinación de temperaturas y niveles de potencial hídricos se selecciono para simular el impacto de diferentes niveles de sequía y de bajadas de temperaturas y su interacción. El experimento duró un total de 48 días.

El ensayo se realizó en una cámara de cultivo de la marca *Ibercex* Se realizó el experimento en dos momentos diferentes debido a la imposibilidad de manejar todo el material a la vez y por falta de espacio en las cámaras de germinación diferenciando entre la parte izquierda y derecha de la cámara. Por tanto se consideraron cuatro bloques (2 lados de la cámara por 2 momentos) completos al azar. Para cada combinación de tratamientos y bloques se utilizaron 100 semillas distribuidas en cuatro placas Petri de 10 cm de diámetro con 25 semillas cada una. Para mantener el potencial hídrico constante durante todo el experimento, tanto el papel como la solución se cambiaron cada cuatro días (Falleri, 1994). Se considero que las semillas habían germinado cuando la radícula emergía al menos 1 mm del tegumento (Come, 1970). El seguimiento de la germinación fue diario.

Diseño experimental

Se utilizó un diseño experimental basado en un modelo factorial (ec. 2) que fue analizado mediante Proc Mixed de SAS 9.1 (SAS Institute Inc., 2004) debido a la heterogeneidad de varianzas del efecto de la sequía (σ_j^2). La variable analizada es el porcentaje de semillas germinadas.

$$[\text{ec. 2}] \quad Y_{ijkl} = \mu + \alpha_i + \beta_j + \gamma_k + \delta_l + \beta\gamma_{jk} + \beta\delta_{jl} + \gamma\delta_{kl} + \beta\gamma\delta_{jkl} + \varepsilon_{ijkl}$$

Donde,

Y_{ijkl} : Porcentaje de semillas germinadas en el bloque i de la procedencia l bajo los tratamientos de estrés hídrico j y de frío k .

μ : efecto de la media general

α_i : efecto del bloque

β_j : efecto de la sequía



γ_k : efecto del frío

δ_l : efecto de la procedencia

$\varepsilon_{ijkl} \rightarrow N(0, \sigma_j^2)$

i : 1, 2, 3 y 4; j : 1, 2, 3 y 4; k : 1,2 y 3; l : 1,2, 3 y 4

Se han realizado contrastes individuales, para cada procedencia, de cada uno de los tratamientos ensayados frente al tratamiento de F3 y 0 bares de potencial hídrico que se considera control.

4. Resultados

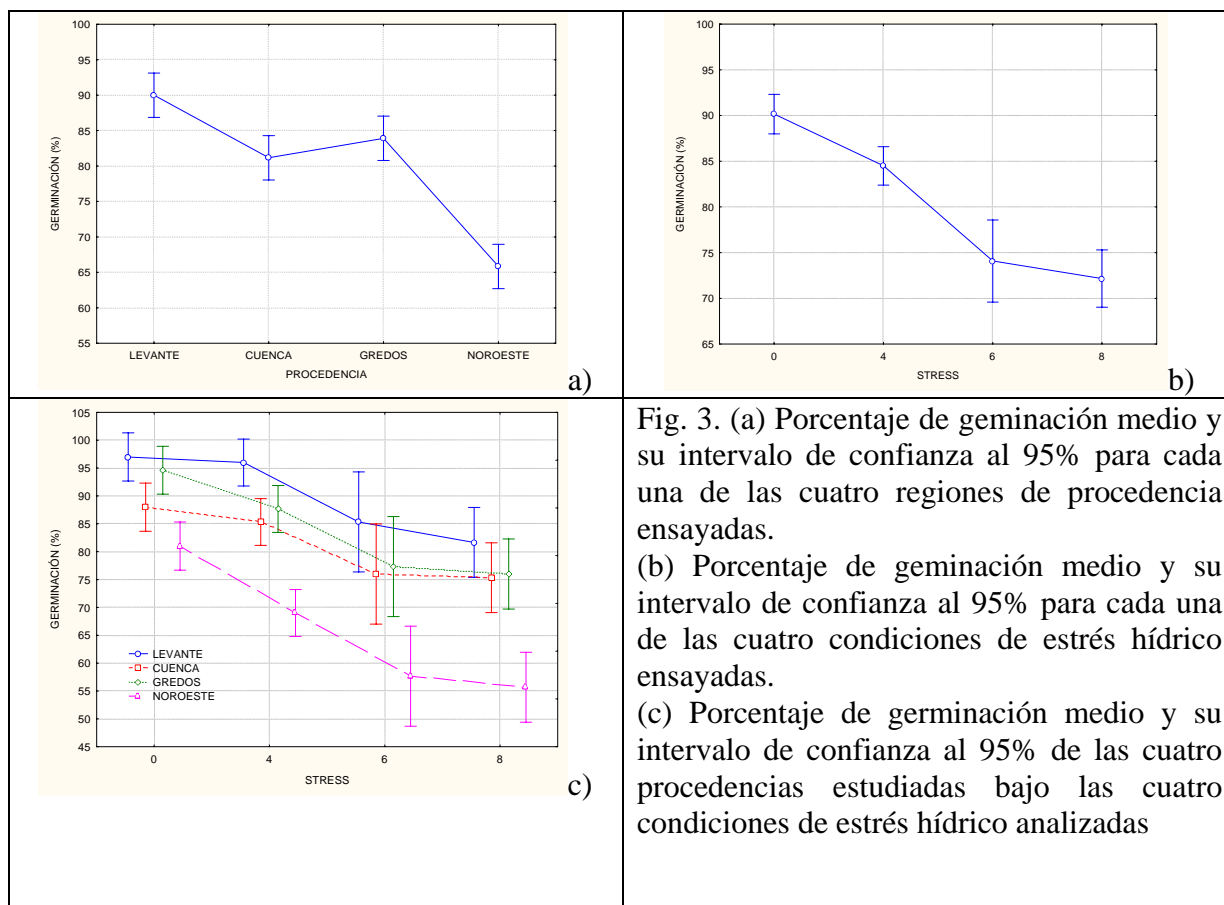
Mediante un experimento de germinación en laboratorio se han evaluado la respuesta de cuatro procedencias representativas de los pinares de *Pinus pinaster* a diferentes condiciones de estrés hídrico y de temperatura. Tan solo los efectos del estrés hídrico y de la procedencia (ambos con $p < 0,0001$) y la interacción triple entre el estrés hídrico, el frío y la procedencia ($p < 0,05$) han resultado significativos (Tabla 2)

Efecto	Grados de libertad	Valor de la F	Pr > F
Bloque	3	2,57	0,0571
Estrés hídrico	3	35,37	< 0,0001
Frío	2	1,09	0,3385
Estrés*Frío	6	1,05	0,3932
Procedencia	3	42,26	< 0,0001
Estrés*Procedencia	9	1,23	0,2796
Frío*Procedencia	6	0,53	0,7827
Estrés*Frío*Procedencias	18	2,06	0,0102

Tabla 2. Test de tipo 3 de los efectos fijos analizados para determinar el impacto del estrés hídrico y del frío sobre la germinación de cuatro procedencias españolas de *Pinus pinaster*

Las semillas de la región de procedencia Noroeste son las que han presentado, en todos los tratamientos de estrés hídrico estudiadas, el porcentaje de germinación más bajo (fig. 3) El porcentaje de germinación promedio obtenido en todas las regiones de procedencias (tabla 3), ha sido superior al 80 %, excepto en la región Noroeste ha presentado un porcentaje de germinación igual a 65,83 %. La región de procedencia que mejor ha resistido el estrés hídrico ha sido la de Levante.

El estrés hídrico ha reducido el porcentaje de germinación (fig. 4) desde un 90,17 % (situación control, $\psi = 0$ bares) hasta el 72,17 % en el caso del estrés hídrico más severo ($\psi = -8$ bares) Mediante el test de diferencias de medias se detectan diferencias entre el tratamiento de estrés hídrico control ($\psi = 0$ bares) con el tratamiento $\psi = -4$ bares ($p = 0,0003$) y con el resto de tratamientos ($p < 0,0001$) así como entre el tratamiento $\psi = -4$ con el resto de los tratamientos ($p < 0,0001$). No existen diferencias significativas entre los tratamientos de estrés hídrico más severos ($\psi = -6$ y $\psi = -8$ bares)



La interacción triple significativa muestra que el régimen térmico modula la respuesta de la tasa de germinación para las diferentes procedencias. La región que se segrega del resto, al comparar los intervalos de confianza de los porcentajes de germinación, es la del Noroeste. Al realizar los contrastes con respecto al tratamiento testigo (tabla 3) observamos que la mayoría de las diferencias significativas se obtuvieron en la región Noroeste lo que concuerda con las tasas de germinación observadas.

Potencial hídrico (ψ) en bares	Procedencias			
	SERRANÍA DE CUENCA	SIERRA DE GREDOS	LEVANTE	NOROESTE COSTERA
<i>Estrés por frío (F1)</i>				
0	ns	ns	ns	ns
- 4	ns	ns	0,0247	ns
- 6	ns	ns	ns	ns
- 8	ns	ns	ns	<0,0001
<i>Estrés por frío (F2)</i>				
0	ns	ns	ns	ns
- 4	ns	ns	ns	ns
- 6	0,0129	0,0068	ns	0,0068
- 8	ns	0,0020	< 0,0001	0,0079
<i>Estrés por frío (F3)</i>				
- 4	ns	ns	ns	0,0151
- 6	ns	0,0412	ns	0,0011
- 8	ns	0,0020	ns	0,0263

Tabla 3. *p*-valores obtenidos para las diferencias significativas entre los contrastes individuales con respecto al tratamiento testigo (estrés por frío, F3, y potencial hídrico igual a 0 bares)

5. Discusión

En el presente trabajo se ha estudiado la influencia del estrés hídrico y del frío en cuatro procedencias representativas de diferentes condiciones ecológicas en las que habita *Pinus pinaster* en España. El estrés hídrico y la procedencia han presentado efectos significativos así como la interacción triple entre el estrés hídrico, la procedencia y el tratamiento de frío. La procedencia Noroeste es la que muestra diferencias con el resto de las analizadas. Este resultado concuerda con la división en subespecies de esta especie. La región de procedencia Noroeste se incluye dentro de la subespecies *Pinus pinaster* ssp *atlantica* H. del Villar (Tutin and Heywood, 1964 y Mirov, 1967) mientras que el resto de las procedencias estudiadas se incluyen dentro de la subespecie *Pinus pinaster* ssp *pinaster* (*P. mesogeensis* F. et Gausson) A través del estudio de marcadores genéticos, Baradat y Marpeau (1988) distinguieron 18 razas de *Pinus pinaster* agrupadas en tres grandes grupos: grupo atlántico (poblaciones de Portugal, noreste de España incluyendo las procedencias del Noroeste y de Sierra de Gredos y las Landas francesas), grupo mediterráneo europeo (Italia, Sureste de Francia y de España, islas mediterráneas), grupo magrebí (poblaciones de Marruecos, Argelia, Túnez, isla de Pantellaria y Sierra Bermeja en España). La subespecie *atlantica* desarrolla un crecimiento mayor que la subespecie *pinaster* (Bravo-Oviedo et al, 2004) que está más adaptada a las condiciones limitantes de la cuenca del Mediterráneo.

Para todos los tratamientos de estrés hídrico se mantiene siempre el mismo orden en las tasas de germinación. En todos los tratamientos la región de procedencia Levante presenta las tasas de germinación más alta mientras que la del Noroeste es siempre la que tiene menores porcentajes de germinación. Gredos y Cuenca siempre están en una situación intermedia.

Existen diversos trabajos analizando la respuesta germinativa de diferentes pinos mediterráneos a los cambios de temperatura como por ejemplo *Pinus pinaster* (Castro et al, 1990, Tapias et al, 2001, Herrero et al, 2007), *Pinus halepensis* (Núñez y Calvo, 2000,

Trabaud, 2000, Tapias et al, 2001) *Pinus sylvestris* (Escudero et al, 1997, Núñez y Calvo, 2000, Núñez et al, 2003), *Pinus nigra* (Escudero et al, 1997, Tapias et al, 2001), *Pinus pinea* (Tapias et al, 2001) o *Pinus brutia* (Thanos et al, 1989), pero en casi todos los casos se trata del efecto del calor y no del frío.

La región de procedencia Noroeste es muy sensible a los tratamientos ensayados (reducciones en la tasa de germinación de hasta el 46%) En todos los tratamientos de estrés por frío y de estrés hídrico, la región Noroeste costera es la que ha sufrido las mayores disminuciones en sus tasas de germinación (tabla 5) llegando hasta un 46%. Los contrastes individuales muestran que la reducción de la temperatura de 20 a 4 °C disminuye el efecto del estrés hídrico en la procedencia Noroeste. En el caso de la procedencia Gredos, si la reducción de temperatura no llega al nivel de heladas, ocurre el mismo efecto descrito en el caso anterior.

Estudiando la respuesta fisiológica, mediante los cambios de nivel del ácido jasmónico, en semillas de *Pinus pinaster* a estrés hídrico y de frío, Pedranzani et al (2007) encontraron que la respuesta al estrés hídrico es más acusada que frente al frío. Este resultado concuerda con nuestros hallazgos en los que los tratamientos de estrés hídrico han sido significativos mientras que los niveles de frío ensayados no han tenido un efecto significativo. Niveles de frío más intensos es posible que tuviesen una respuesta diferenciada.

Los modelos utilizados para hacer las previsiones de cambio climático durante las próximas décadas (IPCC, 2007) muestran que en la cuenca del Mediterráneo se producirá un incremento generalizado de las temperaturas junto con una acusada irregularidad de las precipitaciones. Bajo estos escenarios es fundamental conocer la influencia del clima sobre los procesos demográficos claves en los bosques. Nuestros resultados indican que el estrés hídrico condiciona claramente la germinación de *Pinus pinaster*. Dada la diferente respuesta de las regiones de procedencias ensayadas, la selección del origen de la semilla en los planes de repoblación forestal o el momento óptimo para iniciar las cortas de regeneración es clave para perpetuar las masas forestales en el marco de sistemas de gestión forestal sostenible.

6. Conclusiones

Las conclusiones del presente trabajo son las siguientes:

1. La región de procedencia Noroeste costera presenta una tasa de germinación más baja que las procedencias mediterráneas.
2. Los tratamientos hídricos más severos ($\psi = -6$ y $\psi = -8$ bares) muestran unas tasas de germinación menores que son significativamente diferentes ($p < 0,0001$) de los otros tratamientos de estrés hídrico.
3. La interacción triple ensayada (procedencia, frío y estrés hídrico) resultó significativa
4. No existen diferencias significativas entre los niveles de frío promediando en procedencias y niveles de stress.

7. Agradecimientos

Los autores de este trabajo agradecen a Inés Villamediana, Ana Isabel de Lucas, Celia Herrero, Carlos del Peso y Encarna Rodríguez que colaboraron en el trabajo experimental. Hilda Pedranzani (Universidad Nacional de San Luis, Argentina) dio orientaciones valiosas para el desarrollo del trabajo de laboratorio en sus momentos iniciales. Este trabajo es parte

del proyecto de investigación AGL-2007-65795-C02-01 financiado por el Plan Nacional del I+D+i del Ministerio de Ciencia e Innovación.

8. Bibliografía

ALÍA R., MARTÍN S., DE MIGUEL J., GALERA R., AGÜNDEZ D., GORDO J., SALVADOR L., CATALÁN G., GIL L., 1996. Regiones de procedencia, *Pinus pinaster* Aiton. Ministerio de Medio Ambiente, Organismo Autónomo Parques Nacionales (DGCONA), Madrid.

BARADAT, Ph, MARPEAU, A. 1988 Le pin maritime *Pinus pinaster* Ait. Biologie e génétique des terpènes pour la connaissance et l'amélioration de l'espèce. Thèse Université Bordeaux I

BRAVO-OVIEDO, A., DEL RÍO M., MONTERO, G. 2004. Site index curves and growth model for Mediterranean maritime pine (*Pinus pinaster* Ait.) in Spain *Forest Ecology and Management*. 201:187-197

BRAVO-OVIEDO, A., DEL RÍO M., MONTERO, G. 2007. Geographic variation and

CASTRO, J.F., BENTO, J., REGO, F. 1990. Regeneration of *Pinus pinaster* forest after wildfire *In Fire in Ecosystem Dynamics Edited by Goldammer, J.G., Jenkins, M.J.* SPB Academic Publishing, The Hague, pp 71-75

COME, D. (1970) Les obstacles à la germination. Masson, Paris

ESCUADERO, A., BARRERO, S., PITA, J.M. 1997. Effects of high temperatures and ash on seed germination of two Iberian pines (*Pinus nigra* ssp. *Salzmannii*, *Pinus sylvestris* var. *iberica*) *Ann. Sci. For.* 54:553-562

FALLERI, E. 1994. Effect of water stress on germination in six provenances of *Pinus pinaster* Ait. *Seed Science and Technology* 22:591-599

HERRERO, C., SAN MARTIN, R., BRAVO, F. 2007., Fire effect upon *Pinus pinaster* and *Cistus laurifolius* germination *Journal of Arid Environment* 70:540-548 doi:10.1016/j.aridenv.2006.12.027

IPCC (INTERGOVERNMENTAL PANEL ON CLIMATE CHANGE) 2000. Land use, land-use change, and forestry. Special Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change. Cambridge University Press, Cambridge.

IPCC 2001. Climate Change 2001. The scientific basis. Contribution of Working Group I to the Third Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change. Cambridge University Press, New York.

IPCC 2007. Summary for Policymakers. In Solomon, S., D. Qin, M. Manning, Z. Chen, M. Marquis, K.B. Averyt, M. Tignor and H.L. Miller (eds.). *Climate Change 2007: The Physical Science Basis. Contribution of Working Group I to the Fourth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change*. Cambridge, UK: Cambridge University Press.



- MICHEL, B.E. 1983 Evaluation of the water potentials of solutions of Polyethylene Glycol 8000 both in the absence and presence of other solutes *Plant Physiology* 72:66-70
- MICHEL, B.E., KAUFMANN, M., R. 1973 The osmotic potential of Polyethylene Glycol 6000 *Plant Physiology* 51:914-916
- MIROV, N.T. 1967. *The Genus Pinus* The Ronald Press Company, New York, 602 pp.
- NÚÑEZ, R., CALVO, L. 2000. Effect of high temperatures on seed germination of *Pinus halepensis* and *Pinus sylvestris* *Forest Ecology and Management* 131:183-190
- NÚÑEZ, R., BRAVO, F., CALVO, L. 2003. Predicting the probability of seed germination in *Pinus sylvestris* L. and four competitor shrub species after fire *Annals of Forest Science* 60:75-81
- PEDRANZANI, H., SIERRA-DE-GRADO, R., VIGLIOCCO, A., MIERSCH, O., ABDALA, G. 2007 Cold and water stresses produce changes in endogenous jasmonates in two populations of *Pinus pinaster* Ait. *Plan Growth Regulation* 52:111-116
- RIBEIRO, M.M., PLOMION, C., PETIT, R., VENDRAMIN, G.G., SZMIDT, A.E. 2001 Variation in chloroplast single-sequence repeats in Portuguese maritime pine (*Pinus pinaster* Ait.) *Theor. Appl. Genet.* 102:97-103
- SAS INSTITUTE INC (2004) SAS/STAT(R) 9.1. User's guide. SAS Institute Inc., Cary, N.C.
- TAPIAS, R., GIL, L., FUENTES-UTRILLA, P., PARDOS, J.A. 2001. Canopy seed bank in Mediterranean pines of South-eastern Spain: a comparison between *Pinus halepensis* Mill., *P. pinaster* Ait., *P. nigra* Arn., and *P. pinea* L. *Journal of Ecology* 89:629-638
- THANOS, G.A., MARCOU, S., CHRISTODOUKAKIS, P., YANNITSAROS, A. 1989. Early post-fire regeneration in *Pinus brutia* forest ecosystems of Samos island (Greece) *Acta Oecol.-Oecol. Plant.* 10:79-94
- TRABAUD, L. 2000. Post-fire regeneration of *Pinus halepensis* forest in the west Mediterranean *In Ecology, biogeography and management of Pinus halepensis and P. brutia* forest ecosystems in the Mediterranean basin *Edited by Neèman, G, y Trabaud, L.* Backhuys Publishers, pp 257-268
- TUTIN, T.G., HEYWOOD, H.H. 1964. *Flora europaea*. Cambridge University Press