

**UNIVERSIDADE TÉCNICA DE LISBOA**  
**INSTITUTO SUPERIOR DE AGRONOMIA**

**OPTIMIZAÇÃO DA CONSERVAÇÃO DA LANDE E SEU EFEITO**  
**NA QUALIDADE DAS PLANTAS DO SOBREIRO (*QUERCUS SUBER. L.*)**

**Hachemi Merouani**

Orientador: Professor João Manuel Dias dos Santos Pereira

Co-orientadora: Professora Maria Helena Reis de Noronha Ribeiro de Almeida

**JÚRI:**

**Presidente:**

Reitor da universidade Técnica de Lisboa

**Vogais:**

Doutor Alfredo Augusto Cunhal Gonçalves Ferreira, professor catedrático Aposentado da Universidade de Évora, na qualidade de especialista;

Doutor João Manuel Dias dos Santos Pereira, professor catedrático do Instituto Superior de Agronomia da Universidade Técnica de Lisboa;

Doutor Manuel Armando Valeriano Madeira, professor catedrático do Instituto Superior de Agronomia da Universidade Técnica de Lisboa;

Doutora Maria Helena Reis de Noronha Ribeiro de Almeida, professora associada do Instituto Superior de Agronomia da Universidade Técnica de Lisboa;

Doutora Marta Pardos, investigadora titular do CIFOR – Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agrária y Alimentaria, Espanha;

Doutora Maria da Conceição Brálio de Brito Caldeira, investigadora auxiliar do Instituto Superior de Agronomia da Universidade Técnica de Lisboa.

**DOUTORAMENTO EM ENGENHARIA FLORESTAL**

**LISBOA**

**2011**



**UNIVERSIDADE TÉCNICA DE LISBOA**  
**INSTITUTO SUPERIOR DE AGRONOMIA**

**OPTIMIZAÇÃO DA CONSERVAÇÃO DA LANDE E SEU EFEITO**  
**NA QUALIDADE DAS PLANTAS DO SOBREIRO (*QUERCUS SUBER. L.*)**

**Hachemi Merouani**

*Orientador:* **Professor João Manuel Dias dos Santos Pereira**

*Co-orientadora:* **Professora Maria Helena Reis de Noronha Ribeiro de Almeida**

**JÚRI:**

**Presidente:**

Reitor da universidade Técnica de Lisboa

**Vogais:**

Doutor Alfredo Augusto Cunhal Gonçalves Ferreira, professor catedrático Aposentado da Universidade de Évora, na qualidade de especialista;

Doutor João Manuel Dias dos Santos Pereira, professor catedrático do Instituto Superior de Agronomia da Universidade Técnica de Lisboa;

Doutor Manuel Armando Valeriano Madeira, professor catedrático do Instituto Superior de Agronomia da Universidade Técnica de Lisboa;

Doutora Maria Helena Reis de Noronha Ribeiro de Almeida, professora associada do Instituto Superior de Agronomia da Universidade Técnica de Lisboa;

Doutora Marta Pardos, investigadora titular do CIFOR – Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agrária y Alimentaria, Espanha;

Doutora Maria da Conceição Brálio de Brito Caldeira, investigadora auxiliar do Instituto Superior de Agronomia da Universidade Técnica de Lisboa.

**DOUTORAMENTO EM ENGENHARIA FLORESTAL**

**LISBOA**

**2011**

**“Tese apresentada neste Instituto para obtenção do grau de Doutor”**

*Dedico este trabalho a toda a minha família, em particular a minha esposa e aos meus filhos, Ryma e Beramtane, por os estímulos que me impulsionaram ao longo deste árduo trabalho acadêmico, os meus agradecimentos por terem aceitado se privar de minha companhia pelos estudos, concedendo a mim a oportunidade de realizar-me ainda mais.*

## Agradecimentos

O desenvolvimento e conclusão desta tese não teriam sido possíveis sem o apoio de grande número de pessoas e instituições.

O meu profundo agradecimento é dirigido ao Professor catedrático João Manuel Dias dos Santos Pereira pela orientação deste trabalho e confiança em mim depositada para a sua concretização,

Uma sincera expressão de gratidão vai também à Professora Maria Helena Reis de Noronha Ribeiro de Almeida, co-orientadora desta tese, pelos incentivos e apoios que sempre me dispensou e pela amizade e disponibilidade demonstradas ao longo destes anos,

Gostaria, Também, agradecer sinceramente a Professora Helena Pereira pelo apoio e incentivos manifestados logo no início da minha chegada. Um profundo reconhecimento à Professora Manuela Branco, à Professora Manuela Chaves, ao Professor Pinto Ricardo, ao doutor João Moroco e ao Doutor José Passarinho pela participação activa em determinadas tarefas deste trabalho,

Ao Engenheiro João Pósser de Andrade um especial agradecimento por, não só, disponibilizar a sua Herdade para desenvolver este trabalho, mas também pela ajuda incondicional para a sua implementação disponibilizando infra-estruturas e meios para a abertura da empresa,

São muitas as pessoas que tentaram ajudar e não é possível nomeá-los pessoalmente; a todos deixo a minha profunda gratidão. Um grande abraço vai especificamente ao Rui Matias, Miguel Almeida, Pedro Azevedo pela amizade, disponibilidade e ajuda que me deram sempre que necessitei e ao Professor Celestino Ruivo da Universidade do Algarve que, pela sua genialidade técnica, permitiu a confecção do protótipo da linha de processamento,

Um profundo agradecimento é reservado para as instituições nacionais e europeias, nas pessoas dos seus responsáveis, por me permitir alcançar os objectivos e um sonho académico de longa data:

- À Universidade de Abderahmane Mira de Bejaia (Argélia) e ao Instituto Superior de Agronomia (ISA) da Universidade Técnica de Lisboa (Portugal) por permitir a realização e o bom desenvolvimento desta investigação científica,

- À Fundação para a Ciência e a Tecnologia (FCT) pela bolsa de Doutoramento SFRH/BD/6277/2001 e pelos incentivos no âmbito do projecto POCTI/41359/AGG/2001,

Às instituições da União Europeia pelos incentivos concedidos através de projectos (FAIR5-CT97-3484, CREOAK-QLK5-CT-2002-01594) para o desenvolvimento e aplicação dos trabalhos da investigação e a Agência de Inovação (AdI) através da iniciativa Neotec pela promoção e valorização dos resultados de I&D,

- À administração dos serviços florestais, nomeadamente o Centro Nacional de Semente Florestal (CENASEF, Amarante) pela disponibilização das câmaras de frio no arranque deste trabalho,

- À INOVISA\_ Associação para Inovação e Desenvolvimento Empresarial\_ do ISA pelo apoio prestado na fase inicial da implementação prática dos resultados da investigação (*Spin-off*),

- Ao laboratório de semente da Estação Florestal Nacional (EFN) e de ecofisiologia molecular das plantas do Instituto de Tecnologia Química e Biológica (ITQB) pela disponibilização de equipamentos específicos a realização de algumas experimentações,

- As Associações de Produtores Florestais, em particular a do Vale do Sado (ANSUB) e do Conselho de Coruche (APFC) pela sua disponibilidade e ajuda sempre que necessitei,

- Ao parceiros do Concurso Nacional de Inovação organizado pelo Banco Espírito Santo (BES) e a Fundação João Lopes Fernandes (FJLP) pela avaliação, reconhecimento e promoção deste trabalho e pelos prémios concedidos,

Finalmente, um agradecimento muito especial a todos aqueles que, de perto ou de longe, colaboraram para a execução deste trabalho e facilitaram a minha integração e em particular aos amigos e colegas dos diferentes grupos do Departamento de Engenharia Florestal do ISA.

## **Resumo**

A rápida perda de viabilidade da lande do sobreiro (*Quercus suber* L.), semente recalcitrante, representa uma das limitações da regeneração. O procedimento de conservação no frio (2-4°C) preconizado para prorrogar a longevidade das sementes de Quercíneas revelou-se ineficaz: as sementes perdem a viabilidade em menos de 3 meses e os custos do seu processamento são muito elevados. O objectivo deste estudo é a optimização da conservação da lande por um período mínimo de 6 meses como vista a disponibilizar permanentemente o material de reprodução de alta qualidade e, conseqüentemente, melhorar o sucesso da regeneração.

Com base no processamento habitual das sementes recalcitrantes, procedeu-se à conservação da lande, tendo em conta o individuo produtor e o tipo de saco, e avaliou-se o seu comportamento fisiológico, antes e durante a conservação, para compreender a biologia do processo e o impacto da árvore-mãe. Em paralelo, avaliou-se o efeito da conservação na qualidade das plantas. De seguida, monitorizou-se a maturação da lande para definir o momento adequado para a colheita e avaliou-se a sua qualidade sanitária inicial bem como o seu efeito no vigor da planta. Com o objectivo de demonstração da técnica de conservação e de alertar para as suas limitações, analisou-se o comportamento da lande aos 5 e aos 17 meses. No âmbito da implementação da técnica, avaliou-se o efeito do tempo de produção em viveiro (TPV) e da fertilização na qualidade das plantas.

Foi desenvolvido um novo procedimento de conservação ao frio húmido de semente do sobreiro por um período de 12-15 meses (12-15MC) e implementado à escala real com desenvolvimento de um prototipo eficiente da linha de processamento. Trata-se de um processo tecnológico patenteado® que altera radicalmente o procedimento habitual de conservação da semente. Baseia-se no controlo da maturação que garante a qualidade inicial da lande, no rigor e rapidez dos tratamentos (termoterapia e secagem) e na melhoria das condições de conservação. A qualidade do material vegetal resultante desta inovação é significativamente melhorada quando se compara com o material vegetal habitual. De facto, a germinação da semente conservada torna-se rápida e uniforme e o potencial de crescimento das raízes (PCR) da planta é significativamente superior ao da planta convencional e similar ao da planta fertilizada.

***Palavras-chave:*** *Conservação da lande, sobreiro, qualidade do material florestal de reprodução (MFR), regeneração assistida.*

**Abstract: Optimization of Cork oak (*Quercus suber* L.) seed storage and its impact on seedling quality**

Rapid loss of viability of cork oak (*Quercus suber* L.) recalcitrant acorns represents one of the limitations to their regeneration. The cold storage procedure (2-4°C) recommended for extending seed longevity of *Quercus* genus proved ineffective: the harvest is totally lost within 3 months of storage and the processing costs are very high. The main objective of this study was the optimization of acorns storage for a minimum period of 6 months in order to permanent availability of high quality reproductive material and, consequently, to enhance the reforestation success.

We performed the acorns storage taking in account the mother-tree and bag type, and assessed their physiological behavior, before and at different times of storage, to understand the biology process and the impact of tree-mother in storing success. In parallel, we assessed the effect of storing on the seedling quality. Then we monitored the acorn maturation to set the right time for harvesting and assessed its initial sanitary quality as well as its effect on the seedling vigor. In order to demonstrate the storage technique and inform against its limitations, we analyzed the acorn quality at two storage levels (5 and 17 months). In the context of implementation of the technique, we assessed the effect of nursery time production (NTP) and fertilization on the seedling growth potential.

A new procedure of cork oak acorn wet-cold storage was developed for a period of 12-15 months (12-15MC) and implemented at real scale with developing an efficient prototype of acorn processing. The technologic process was patented® and amend radically the usual seed storage procedure. The effectiveness of long-term storage depends on the maturation control which guarantees the initial acorn quality, on the accuracy and speed of treatments (thermotherapy and drying) and on the storage conditions improvement. The quality of acorn and seedling from this innovation was significantly improved when compared to the usual reproductive material. Hence, germination of stored acorn becomes rapid and uniform and root growth potential (PCR) of subsequent seedling was significantly higher than the conventional seedling and similar to the fertilized one.

***Keywords:*** Acorn storage, Cork oak, forest reproductive material (FRM), assisted regeneration

## Índice

<b>1. Introdução</b> .....	1
1.1. <i>Enquadramento</i> .....	1
1.2. <i>Objectivos da tese</i> .....	4
1.3. <i>Principais resultados</i> .....	5
1.4. <i>Estrutura da tese</i> .....	5
Referências .....	6
<b>2. Estado do conhecimento</b> .....	9
2.1. Delimitação e caracterização da região “ <i>eu-mediterrânica</i> ” .....	9
2.1.1. <i>Grupo de espécies de folhagem persistente</i> .....	10
2.1.2. <i>Grupo de espécies de folhagem caduca</i> .....	11
2.2. Principais características da biologia das sementes de Quercíneas .....	12
2.2.1. <i>Maturação e estado sanitário da semente</i> .....	13
2.2.2. <i>Vulnerabilidade das sementes</i> .....	13
2.2.3. <i>Irregularidade de produção de semente</i> .....	14
2.3. Problemas da floresta “ <i>eu-mediterrânica</i> ” .....	15
2.3.1. <i>Degradação dos ecossistemas</i> .....	15
2.3.2. <i>Deficiência de regeneração natural</i> .....	16
2.3.3. <i>Ineficácia da regeneração artificial</i> .....	16
Referências .....	18
<b>3. Artigos integrantes da tese</b> .....	25
<b>4. Conclusão geral</b> .....	89
<b>Anexos</b> .....	91

## 1. Introdução

### 1.1. Enquadramento

O papel que a floresta nativa da zona “*eu-mediterrânica*” (Quercíneas), em particular a do sobreiro (*Quercus suber* L.), desempenha à escala regional e global é bem reconhecido e reuniu um consenso geral de toda a sociedade científica, civil e política desde há muito anos (e.g. FAO/UNESCO, 1963; CNUD, 1992). De facto, para além dos seus bens directos e indirectos (e.g. Mendes, 2002; Coitoru e Merlo, 2005) que sustentaram as várias civilizações (Blondel, 2008), estes ecossistemas são fontes intermináveis de outros serviços ambientais de grande relevância para a Sociedade (MEA, 2005; Hulse, 2008) e dos quais é de salientar a conservação dos solos (El Alaoui, 1978; Beissalah *et al.*, 1988; David *et al.*, 2004), a biodiversidade (MEA, 2005; Pereira *et al.*, 2002; Vogiatzakis *et al.*, 2006), a sequestração de carbono (Balboa-Murias *et al.*, 2006; Gratani e Varone 2006; Matthew *et al.*, 2007; Pereira *et al.*, 2007; Cañellas *et al.*, 2008) e a regulação atmosférica (Zhang *et al.*, 1999). A reabilitação da região mediterrânica, i.e. a conservação dos ecossistemas existentes recorrendo as práticas de gestão sustentada (Scarascia-Mugnozza *et al.*, 2000; Bugalho *et al.*, 2011) e a regeneração artificial (sementeira e plantação) das áreas degradadas (incendiadas e convertidas), é um desafio contemporâneo fortemente aclamado para combater a desertificação e mitigar os efeitos das mudanças climáticas (CNUD, 1992; protocolo de Quioto, 2009). No caso específico da regeneração artificial, finalidade deste estudo, e tendo em conta o aumento dos riscos de incêndios, aridez e pragas (Santos e Miranda, 2006; Gao e Giorgi, 2008), vários estudos (Pereira *et al.*, 2002; Zerbe, 2002; Rock *et al.*, 2004; Almeida, 2005; Almeida *et al.*, 2009) indicam que a escolha da espécie de reflorestação bem com a proveniência do seu material de reprodução (semente/planta), a valorização de novos produtos e serviços e uma investigação aplicada são requisitos fundamentais para o sucesso desta acção. Neste contexto, o sobreiro representa uma das espécies mais apropriada, isso devido a sua resistência ao fogo (cortiça), bem como a tolerância à secura (Faria *et al.*, 1996 e 1998; Grant *et al.*, 2010) e à contaminação do solo (Gogorcena *et al.* 2001), a sua rapidez de resposta aos stresses (Gogorcena *et al.*, 2001; Cerasoli *et al.*, 2004; Pereira *et al.*, 2007) e a sua valorização sócio-económica e ambiental (Blondel e Aronson, 1995; Aronson *et al.*, 2009). Perante

estas prevalências, os ecossistemas de sobreiro são qualificados de “*barreira natural*” contra a desertificação (Rêgo *et al.*, 2008).

Infelizmente estes ecossistemas têm sido confrontados com um conjunto de problemas de riscos acrescidos no futuro e que podem comprometer a sua perenidade e sustentabilidade. Por um lado, uma degradação antropogénica ancestral e contínua (Barbero *et al.*, 1990; Butzer, 2005; Hajar *et al.*, 2010) que gerou uma forte limitação da sua regeneração natural (Natividade, 1950; Merouani, 1996; Gómez-Aparicio *et al.*, 2008) e por outro, o recurso à regeneração artificial, particularmente intensiva a partir dos anos 90 como paliativo ao forte desequilíbrio (forte degradação/fraca regeneração), revelou-se frequentemente ineficaz. De facto, logo à instalação as mortalidades são elevadas nas sementeiras tradicionais sem protecção (60-100%) e ultrapassam frequentemente os 50% nas plantações, isso apesar da introdução de novas práticas (vedação e preparação do terreno, protecção individual da planta) que encarecem os custos e perturbam o solo (erosão, actividade micro-orgânica). As causas desta ineficácia são inúmeras (depredação das sementes por animais, deficit hídrico do Verão, compactação do solo, inadequação das técnicas de instalação), mas a fraca qualidade do material florestal de reprodução (MFR) habitualmente utilizado (semente fresca e planta produzida a partir desta) é apontada como a causa primordial (Ciccarese *et al.*, 2004; Villar-Salvador *et al.*, 2004). De facto, no caso das sementeiras as características da lande, i.e. a sua vulnerabilidade à desidratação (semente recalitrante), infecção e ataque pelos insectos e o seu alto valor nutritivo (semente apetitosa), são as condicionantes principais da perda rápida da sua viabilidade e da sua depredação pelos animais (ratos, javalis). No caso das plantações, o fraco potencial de crescimento das raízes da planta (PCR) no momento da sua instalação (Hunt *et al.* 2002; Villar *et al.*, 2004), resultante do elevado tempo da sua permanência no viveiro ( $TPV_{300\text{ cm}^3} > 9$  meses), representa o factor limitativo do arranque de crescimento do sistema radicular, condição inequívoca para atingir as camadas mais profundas e húmidas do solo antes do período de seca estival.

O armazenamento da lande em local fresco e arejado é uma alternativa preconizada desde meados do século XX para minimizar as perdas de viabilidade do lote e poder executar as sementeiras (Natividade, 1950), mas nessa época nem o desenvolvimento científico permitia perceber a fisiologia da lande, nem tecnológico para controlar estas condições (fresco e arejado) e tratar os problemas das

infecções e dos ataques. Só a partir dos anos 70, quando se identificou este grupo de sementes recalcitrantes (Robert, 1973) e se percebeu o risco que esta característica de perda rápida de viabilidade poderia implicar na perenidade das Quercíneas, é que se multiplicaram os estudos no *Quercus robur*, *Q. rubra* e *Q. nigra* principalmente, espécies ecologicamente, fenologicamente e fisiologicamente diferentes do sobreiro. O desenvolvimento de um tratamento térmico (termoterapia) contra *Ciboria batschiana* (Delatour, 1978; Delatour e Morelet, 1979), um fungo particularmente nocivo e letal que se encontra no interior da semente fresca de todas as Quercíneas (Bonnet-Masimbert e Muller, 1973; Bonnet-Masimbert *et al.*, 1977), foi um dos principais avanços e, desde então, adoptou-se um procedimento de conservação a escala real que se generalizou a todas as Quercíneas, incluindo o sobreiro a partir da década de 90. O procedimento tradicional de conservação consiste numa limpeza por flutuação em água, do lote apanhado do chão para eliminar as sementes vazias e outros detritos (folhas, cúpulas), seguida do tratamento térmico (termoterapia: 41°C / 2 horas), da secagem à temperatura ambiente durante um período de 7-15 dias e finalmente da conservação em sacos de ráfia nas câmaras de frio (-2 à 4°C) (e.g. Muller, 1986; Muller e Bonnet-Masimbert, 1984). No entanto, os resultados à escala laboratorial são controversos; a literatura Europeia relata um sucesso por períodos de 3 Invernos a -1°C ou -2°C para *Q. rubra* e *Q. robur* (e.g. Suszka e Tylkowski, 1982), enquanto os trabalhos realizados na América indicam que a viabilidade das sementes é perdida em menos de 6 meses (e.g. Connor *et al.*, 1996). Estudos relativamente recentes confirmaram que a conservação a longo prazo das sementes recalcitrantes é difícil (Bastien, 1992; Finch-Savage, 1992; Hong e Ellis, 1996; Connor e Sowa, 2002) e não existe um protocolo standard de conservação ao longo prazo (Vertucci *et al.*, 1994). No caso do sobreiro, os estudos são escassos; apenas destacando-se duas tentativas mas que não obtiveram sucesso (Claudot, 1974; Gosling, 1989). A implementação deste procedimento de conservação à escala real de viveiro revelou-se ineficaz e é considerada como uma opção arriscada para o sobreiro (Bariteau, 2003; Catalan, 2003). De facto, após 4 meses de conservação as perdas por infecções, desidratação e pré-germinação são elevadas, além de que o custo e tempo do tratamento térmico são altos, o que levou Schröder *et al.*, (2004) a sugerir o recurso à termoterapia apenas no caso de uma intensa infecção inicial das sementes. Vários estudos (Ellis *et al.*, 1990; Pammenter *et al.*, 1991; Finch-Savage, 1992; Guthke e

Sperthmann, 1993; Vertucci *et al.*, 1994 ; Hong e Ellis 1996 ; Connor *et al.*, 1996; Connor e Sowa, 2002) abordaram separadamente as dificuldades da conservação e nenhum deles abrangeu os problemas em conjunto. Hong e Ellis (1996) relatam que a monitorização do teor de água durante o desenvolvimento da semente é indispensável para decidir o momento ideal para a colheita. Vários estudos (Finch-Savage, 1992; Vertucci *et al.*, 1994; Connor *et al.*, 1996) indicam que o controlo do teor de água das sementes antes e durante o armazenamento representa uma das principais dificuldades de conservação ao longo prazo sendo o tipo de saco o factor decisivo deste controlo. Outros (Pammenter *et al.*, 1991; Connor e Sowa, 2002) indicam que a rapidez na fase de secagem pode ser decisiva uma vez que o modelo que descreve as sementes recalcitrantes sugere que, quanto mais rápida a secagem menor o teor de água das sementes podem tolerar. No que diz respeito as pré-germinações durante a conservação (pré-germinações precoces), o problema é atribuído ao facto de serem sementes fortemente hidratadas no momento da conservação e metabolicamente activas mesmo a baixas temperaturas (Guthke e Sperthmann, 1993).

## **1.2. Objectivos da tese**

O objectivo principal deste estudo foi a optimização da técnica de conservação da lande do sobreiro por um período de 6 meses com vista a disponibilizar permanentemente o material florestal de reprodução (MFR), melhorar a sua qualidade e, conseqüentemente, aumentar a taxa de sucesso da reflorestação. Na primeira fase e baseando-nos no processamento habitual, realizou-se a conservação da lande colhida em 12 árvores e avaliou-se o seu comportamento fisiológico, antes e com diferentes tempos de conservação, para compreender a sua biologia, mas também o impacto da árvore-mãe. Em paralelo, avaliou-se o efeito da conservação e da árvore-mãe no estado fisiológico e no crescimento das plantas em condições controladas. De seguida, monitorizou-se a maturação da lande para definir o momento adequado para a colheita e avaliou-se a sua qualidade sanitária inicial bem como o seu efeito na capacidade germinativa e no crescimento da planta. Com o objectivo de demonstrar os resultados da técnica de conservação desenvolvida e alertar para as suas limitações analisou-se o comportamento da lande aos 5 e aos 17 meses. No âmbito da implementação da técnica, avaliou-se o efeito da idade das plantas e da fertilização na qualidade das plantas.

### **1.3. Principais resultados**

Foi desenvolvido um novo procedimento de conservação de semente do sobreiro, potencialmente aplicável a todas as espécies de Quercíneas, e implementado à escala real em diferentes projectos europeus e nacionais e, posteriormente, à escala comercial com desenvolvendo de um prototipo eficiente da linha de tratamento, análise e conservação da semente. Trata-se de um processo tecnológico patenteado® que altera radicalmente o procedimento habitual de conservação da semente. Baseia-se no controlo da maturação, que garante a qualidade inicial da lande, no rigor e rapidez do tratamento térmico e da secagem e das melhorias das condições de conservação, nomeadamente o tipo de saco, a temperatura e a humidade relativa da câmara de conservação. Com o efeito positivo do frio, a qualidade do MFR (semente e planta) é significativamente melhorada quando se compara com o material vegetal habitualmente disponibilizado. A germinação da semente conservada torna-se rápida e uniforme, e o PCR da planta é significativamente superior ao da planta convencional e similar ao da planta fertilizada.

### **1.4. Estrutura da tese**

Este trabalho encontra-se dividido em 4 capítulos. O primeiro capítulo é reservado para a introdução e enquadramento do tema; o segundo capítulo apresenta uma revisão bibliográfica das principais características da zona “*eu-mediterrânica*” (delimitação geográfica, clima, solo e do seu coberto vegetal nativo), da biologia das sementes das Quercíneas e dos seus problemas de degradação e de regeneração (natural e artificial); no terceiro capítulo estão inseridos os principais trabalhos que fazem parte desta tese (publicações), e no quarto capítulo constam as principais conclusões. Em anexo encontram-se as publicações do Registo de Patente®, a homologação da Agência da Inovação para a criação da empresa de base tecnológica (Medida 7.2 do POS\_Conhecimento) e o manual prático de conservação da semente que sumariza os cuidados a ter durante as diferentes fases do processamento da lande para garantir a sua qualidade inicial e o sucesso da conservação.

## Referências

- Almeida, M.H. 2005. Importância do controlo genético e da manipulação dos materiais florestais de reprodução na sustentabilidade dos montados de sobro. *e-ciência, revista de Ciência, Tecnologia e Inovação em Portugal*,: 24-26.
- Almeida, M.H., Merouani H., Costa e Silva P. Cortina J. Trubat R., Chirino E. Vilagrosa A., Khaldi A., Stiti B., El Alami S.L. and Vallejo R. 2009. Germplasm selection and nersery techniques. *In: Aronson et al. (Eds) 2009, Cork Oak Woodlands on the edge. Island Press*
- Aronson, J., Pereira, J.S. and Pausas, J.G. (eds). 2009. Cork oak woodlands on the edge. Island Press, Washington, DC, US.
- Balboa-Murias, M.A., Rojo, A., Álvarez, J.G. and Merino, A. 2006. Carbon and nutrient stocks in mature *Quercus robur* L. stands in NW Spain. *Ann. For. Sci.* 63: 557–565
- Barbero, M., Bonin G. Loisel, R., and Quézel P. 1990. Changes and disturbances of forest ecosystems caused by human activities in the Western part of the Mediterranean basin. *Vegetatio*, 87: 151-173
- Bariteau, M. 2003. Handbook of the EU concerted action on cork oak, FAIR1-CT95 0202-B7/4100, III- Methods. Ed. Varela, Estação Florestal Nacional. 25-32.
- Bastien, Y. 1992. Résultats de semis de glands de conservation en pépinière. *Revue Forestière Française, XLIV*. 5: 430-433.
- Beissalah, Y., Amin T., El Hajzein B. et Neville P. 1988. Etude de l'appareil radical de jeunes plants de chênes verts dont le pivot se développe sans amputation, ni déviation. *Ann. Sci. For.*, 45 (1) : 53-70.
- Blondel, J. 2008. On humans and wildlife in Mediterranean islands. *Journal of Biogeography*, 35: 509–518
- Blondel, J. and Aronson, J. 1995. Biodiversity and ecosystem function in the Mediterranean Basin: human and non-human determinants. *Mediterranean-type ecosystems: the function of biodiversity* (ed. by G.W. Davis and D.M. Richardson), pp. 43–119. *Ecological Studies*, Vol. 109. Springer-Verlag, Berlin
- Bonnet-Masimbert, M. and Muller C. 1973. La conservation des faines et des glands : recherche et perspectives. *Bull. Tech. Off. Nat. For.*, 5: 13-19
- Bonnet-Masimbert, M., Muller, C. and Morelet, M. 1977. De nouveaux espoirs pour la conservation des glands. *Bull. Tech. off Nat. For.* 9, 47-54.
- Bugalho, M.N, Caldeira M.C., Pereira J.S. Aronson J. and Pausas J. 2011. Mediterranean cork oak savanas require human use to sustain biodiversity and ecosystem services. *Front. Ecol. Environ.*, 9(5): 278-286.
- Butzer, K.W. 2005. Environmental history in the Mediterranean world: cross-disciplinary investigation of cause-and-effect for degradation and soil erosion. *Journal of Archaeological Science*, 32:1773-1800
- Cañellas, I., Sánchez-González M., Bogino S. M., Adame P., Herrero C., Roig S., Tomé M., Paulo J. A. and Bravo F. . 2008. Silviculture and Carbon Sequestration in Mediterranean Oak Forests. *Bravo et al. (Eds). Managing Forest Ecosystems: The Challenge of Climate Change*
- Catalan, G. 2003. Handbook of the EU concerted action on cork oak, FAIR I CT 95 0202, IV- Collection of material. Ed. MC Varela, Estaçã Florestal Nacional. 33-45.
- Cerasoli, S., Scartazza A., Brugnoli E., Chaves M.M. and Pereira J.S. 2004. Effects of partial defoliation on carbon and nitrogen partitioning and photosynthetic carbon uptake by two-year-old cork oak (*Quercus suber*) saplings. *Tree Physiology*, 24: 83-90.
- Ciccarese, L., Lucci S. and Mattsson A. 2004. Proceedings of the conference “Nursery production and stand establishment of broadleaves to promote sustainable forest management. Ed. APAT, Dalarna. Rome, Italy. 285 p.
- Claudot, M. 1974. Indications pour la campagne 1974-1975 de récolte, de conservation et de semis de glands des chênes méditerranéens. *Mémoire n°2 du Centre Technique du Génie Rural des Eaux et Forêts France*. 1-32.
- CNUD, 1992. Convenção das Nações Unidas para o Combate à Desertificação - <http://www.unccd.int/>, <http://www.portalsaofrancisco.com.br/alfa/meio-ambiente-agenda-21/>,
- Coitoru, L. and Merlo M. 2005. Valuing Mediterranean Forests towards total economic value. OCAB International. Eds M. Merlo and L. Coitoru, UK.

- Connor, K.F., Bonner, F.T. and Vozzo, J.A. 1996. Effects of desiccation on temperate recalcitrant seeds: differential scanning calorimetry, gas chromatography, electron microscopy, and moisture studies on *Quercus nigra* and *Quercus alba*. *Canadian Journal of Forest Research*, 26, 1813-1821
- Connor, K.F., and Sowa, S. 2002. Recalcitrant behavior of temperate forest tree seeds: storage, Biochemistry, and physiology. In: Outcalt, Kenneth W., ed. Proceeding of the eleventh biennial southern silvicultural research conference, Gen. Tech. Rep. SRS-48. Asheville, NC: U.S. Dept. of Agri., Forest Service, Southern Research Station, 47-50.
- David, T.S., Ferreira M.I., Cohen S., Pereira J.S. and David J.S. 2004. Constraints on transpiration from an evergreen oak tree in southern Portugal. *Agricultural and Forest Meteorology*, 122: 193-205
- Delatour, C. and Morelet M. 1979. La pourriture noire des glands. *Rev. For. Fr.* 31 : 101-115
- Delatour, C., 1978. Recherche d'une méthode de lutte curative contre le *Ciboria batschiana* (Zopf) Buchwald chez les glands. *Eur. J. For. Pathol.* 8, 193-200.
- El Alaoui, H. 1978. Etude expérimental de la morphogénèse du système racinaire du semis de chêne liège (*Quercus suber* L.). Thèse de 3e cycle, Univ. Nancy I, 76 p.
- FAO-UNESCO, 1963. Bioclimatic map of the Mediterranean zone. Explanatory note. Arid zone research. XXI, 7-47
- Faria, T., Wilkins D., Besford R.T., Vaz M., Pereira J.S. and Chaves M.M. 1996. Growth at elevation CO<sub>2</sub> leads to down-regulation of photosynthesis and altered response to high temperature in *Quercus suber* L. seedlings. *Journal of Experimental Botany*, 47 (304): 1755-1761
- Faria, T., Silvério D., Breia E., Cabral R., Abadia A., Abadia J., Pereira J.S. and Chaves M.M. 1998. Differences in the response of carbon assimilation to summer stress (water deficits, high light and temperature) in four Mediterranean tree species. *Physiol. Plantarum*, 102: p. 419-428.
- Finch-Savage, W.E. 1992. Seed development in the recalcitrant species *Quercus robur* L.: germinability and desiccation tolerance. *Seed Science Research*, 2: 17-22.
- Gao, X., Giorgi F. 2008. Increased aridity in the Mediterranean region under greenhouse gas forcing estimated from high resolution simulations with a regional climate model. *Global and Planetary Change*, 62: 195-209
- Gogorcena, Y., Moliás N., Larbi A., Abadía J. and Abadía A. 2001. Characterization of the responses of cork oak (*Quercus suber*) to iron deficiency. *Tree Physiology*, 21, 1335-1340
- Gómez-Aparicio, L. Pérez-Ramos I.M., Mendoza L, Matías J.L., Quero J., Castro R.Z. and Marañón T. 2008. Oak seedling survival and growth along resource gradients in Mediterranean forests: implications for regeneration in current and future environmental scenarios. *Oikos* 117: 1683\_1699,
- Gosling, P.G. 1989. The effect of drying *Quercus suber* acorns to different moisture contents, followed by storage, either with or without imbibition, *Forestry*, 62 (1): 41-49.
- Gratani, L. and Varone L. 2006. Carbon sequestration by *Quercus ilex* L. and *Quercus pubescens* Willd. and their contribution to decreasing air temperature in Rome. *Urban Ecosyst.*, 9: 27–37
- Grant, O.M., Tronina Ł., Ramalho J.C., Besson C.K., Lobo-do-Vale R.I., Pereira J.S., Jones H.G. and Chaves M.M. 2010. The impact of drought on leaf physiology of *Quercus suber* L. trees: comparison of an extreme drought event with chronic rainfall reduction. *Journal of Experimental Botany*, (61)15: 4361–4371
- Guthke, J., Spethmann W., 1993. Physiological and pathological aspects of long-term storage of acorns. *Annals of Science Forest.* 50 (supl. 1): 384-387
- Hajar, L., Haïdar-Boustani M., Khater C. and Cheddadi R. 2010. Environmental changes in Lebanon during the Holocene: Man vs. climate impacts. *Journal of Arid Environments* 74: 746–755
- Hong, T.D. and Ellis R.H. 1996. A protocol to determine seed storage behaviour. IPGRI Technical Bulletin No. 1. (J.M.M. Engels and J. Toll, vol. eds.) International Plant Genetic Resources Institute, Rome, Italy. 62p
- Hulse, J.H. 2008. Sustainable Development at Risk: Ignoring the Past. © Cambridge University Press India Pvt. Ltd., 2007. <http://www.ibcperu.org/doc/isis/9734.pdf>.
- Hunt, R., Causton D.R., Shipley B. and Askew A.P. 2002. A modern tool for classical growth analysis. *Annals of botany* 90: 485-488. ISTA, International Rules for Seed Testing 2003: Biochemical test for viability. The topographical tetrazolium test. 12 Annexe to Chapter 6: Tetrazolium Test 6A-1.
- Matthew, P.D, Berg B., Emmett B. A. and Rowland P. 2007. Decomposition of oak leaf litter is related to initial litter Mn concentrations. *Can. J. Bot.* 85(1): 16–24
- MEA (Millennium Ecosystem Assessment) 2005. Ecosystems and Human Well-being: Biodiversity Synthesis. World Resources Institute, Washington, DC

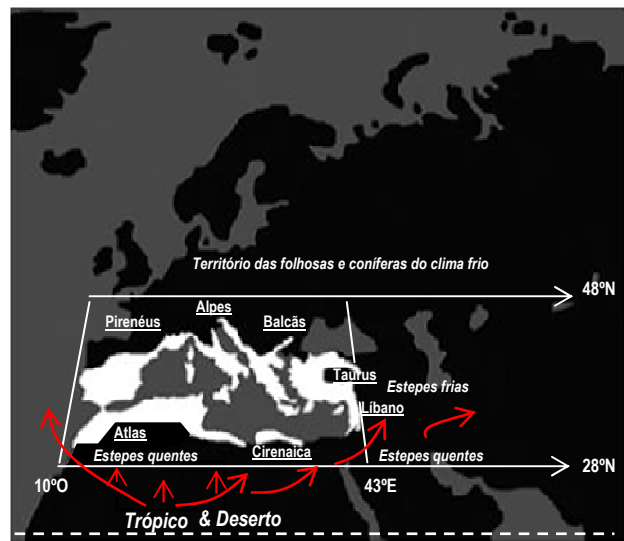
- Mendes, A.M.S.C. 2002. A economia do sector da cortiça em Portugal. Evolução das actividades de produção e de transformação ao longo dos séculos XIX e XX. Documento de trabalho, Universidade Católica Portuguesa, Faculdade de Economia e Gestão, Portugal. 238p.
- Merouani, H. 1996. Contribution à l'étude de la régénération naturelle du chêne liège (*Quercus suber* L.): maturité e germination des glands. Thèse de Magister, Institut de Biologie, Université de Tizi-Ouzou, 127p.
- Muller, C. 1986. Le point sur la conservation des semences forestières et la levée de dormance. *Revue Forestière Française*. XXXVIII, 3: 200-204.
- Muller, C., Bonnet-Masimbert M. 1984. La conservation des glands. In : bilan des essais Menés entre 1976 et 1982. INRA, Centre de Recherches d'Orleans..
- Natividade, J.V. 1950, *Subericultura*, DGSFA, Lisboa.
- Pammenter, N.W., Vertucci C.W. and Berjak P. 1991. Homeohydrous (Recalcitrant) seeds: Dehydration, the state of water and viability characteristics in *Landolphia kirkii*. *Plant Physiology*. 96: 1093-1098.
- Pausas, J.G., Marañón T., Caldeira M. and Pons J. 2009. Natural Regeneration. In: Aronson et al. (Eds) 2009, *Cork Oak Woodlands on the edge*. Island Press.
- Pereira, J.S., Mateus J.A., Aires L.M., Pita G., Pio C., David J.S., Andrade V., Banza J., David T.S., Paço T.A., and Rodrigues A. 2007. Net ecosystem carbon exchange in three contrasting Mediterranean ecosystems – the effect of drought. *Biogeosciences*, 4, 791–802
- Pereira, J.S., Correia A.V., Correia A.P., Branco M., Bugalho M., Caldeira M.C., Cruz C.S., Freitas H., Oliveira A.C., Pereira J.C., Reis R.M. and Vasconcelos M.J. 2002. Forest and biodiversity. In "Climate Change in Portugal. Scenarios, impacts and adaptation measures". F.D. Santos, K. Forbes, and R. Moita, Editors, Gravida, Lisboa, 367-410.
- Protocolo de Quioto, 2009. Convenção Quadro das Nações Unidas sobre Mudanças Climáticas. 26p
- Rêgo, F.C., Vasco I., Carvalho J., Bugalho M., Morgado A. and Silva L.N. 2008. Sobreiro, uma barreira contra a desertificação. Relatório do Centro de Ecologia Aplicada Baeta Neves do ISA e WWF Programa Mediterrâneo, 20p.
- Roberts, E.H. 1973. Predicting the storage life of seeds. *Seed Science and Technology*. 1: 499-514.
- Rock, J., Puettmann K.J., Gockel H.A. and Schulte A. 2004. Spatial aspects of the influence of silver birch (*Betula pendula* L.) on growth and quality of young oaks (*Quercus* spp.) in central Germany. *Forestry*, 77 (3): 235-247.
- Santos, F.D. e Miranda P. 2006. Alterações climáticas em Portugal: cenários, impactos e medidas de adaptação. Projecto SIAM II, Ed. Gravida, Lisboa 2006. 493 p
- Scarascia-Mugnozza, G., Oswald H., Piussi P. and Radoglou K. 2000. Forest of the Mediterranean region: gaps in knowledge and research needs. *For. Ecol. Manage.* 132: 97–109.
- Suszka, B. and Tytkowski T. 1982. Storage of acorns of the English oak (*Q. robur* L.) over 1-5 winters. *Arbr. Kórnichie*. 25: 199-229.
- Vertucci, C.W., Roos E.E. and Crane J., 1994. Theoretical basis of protocols for seed storage. III. Optimum moisture contents for pea seeds stored at different temperatures, *Ann. Bot.* 74: 531-540.
- Villar, R., Ruiz-Robledo J., Quero J.L., Poorter H., Valladores F., and Marañón T. 2004. Tasas de crecimiento en especies leñosas: aspectos funcionales e implicaciones ecológica. *Ecología del bosque mediterráneo en un mundo cambiante*. Ministério de Médio Ambiente. EGRAF, SA, Madrid: 191-227
- Villar-Salvador, P, Planelles R., Enríque E. and Peñelas R.J. 2004. Nursery cultivation regimes, plant functional attributes, and field performances relationships in the Mediterranean oak *Quercus ilex* L. *For. Ecol. Manage.*, 196: 257-266.
- Vogiatzakis, I.N., Mannion A.M. and Griffiths G.H. 2006. Mediterranean ecosystems: problems and tools for conservation. *Progress in Physical Geography*, 30 (2): 175–200
- Zerbe, S. 2002. Restoration of broad-leaved woodland in central Europe on sites with coniferous forest plantation. *For. Ecol. Manage.* 167: 27-42.
- Zhang, L., Dawes W.R., and Walker G.R. 1999. Predicting the effect of vegetation changes on catchment average water balance. *Cooperative Research Centre for Catchment Hydrology*, 35p

## 2. Estado do conhecimento

Após uma caracterização sumaria da região “*eu-mediterrânica*” (delimitação geográfica, clima, solo e vegetação), descrevem-se as principais características da biologia das sementes de Quercíneas e termina-se com os problemas relacionados com a degradação e a regeneração natural e artificial destes ecossistemas.

### 2.1. Delimitação e caracterização da região “*eu-mediterrânica*”

A região “*eu-mediterrânica*”, como foi definida pela FAO/UNESCO (1963), é delimitada pelas cadeias montanhosas situadas, aproximadamente, entre os paralelos 28°S (Atlas, Cirenaica) e 48°N (Alpes, Pirenéus, Balcãs) e longitudinalmente desde o atlântico (Marrocos e Península Ibérica) até sensivelmente 43°E (Taurus, Líbano) (Figura 1). Em altitude, esta estende-se do litoral até níveis variáveis em função da latitude e exposição e definidos pelo frio: 700-1500 m (Atlas), 300-700 m (Alpes e Pirenéus), 400-1800 m (Taurus) e 800-2500 m (Líbano) (Quézel, 1981).



**Figura 1.** Delimitação da região mediterrânea e sentido da desertificação.

Devido as massas de vapor de água do Atlântico que atenuam as temperaturas extremas do Sul e do Norte (tampão térmico) e influenciam o regime hídrico (chuvas, humidade relativa, neve) e a estrutura das cadeias montanhosas (relevo) formando um obstáculo físico a expansão das massas de ar quente do deserto (sirocos), o clima desta região é relativamente temperado ( $t < 10\text{ }^{\circ}\text{C}$ ), com um período árido no Verão ( $P_{\text{mm}} < 2T^{\circ}\text{C}$ ) e outro chuvoso do Outono à Primavera ( $P > 200\text{ mm}$ ). Todavia, o clima varia significativamente em função das latitudes e da altitude; a temperatura reduz-se ( $12\text{ }^{\circ}\text{C} < t < -10\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) e a precipitação aumenta-se (200 a mais de 2000 mm) de Sul a Norte, de Oeste a Leste e dos vales ao top das montanhas (FAO-UNESCO, 1963; Quézel, 1981). Um total de 6 variantes do período seco é definido: 1- *Xerotérmomediterrânica*, 2- *Termomediterrânica acentuada*, 3- *Termomediterrânica atenuada*, 4- *Mesomediterrânica acentuada*, 5- *Mesomediterrânica atenuada* e 6- *supramediterrânica* (FAO-UNESCO, 1963).

De modo geral os solos são na sua maioria calcários, profundos nas médias altitudes e esqueléticos nas altas altitudes sobretudo nas exposições Sul. À escala latitudinal, os solos do Centro e Norte da Europa são relativamente mais profundos e ricos em matéria orgânica do que os do Sul da Europa e do Norte de África.

O coberto vegetal desta zona é, principalmente, composto por 2 grandes grupos de espécies de Quercíneas (*persistente e caduca*) que evoluíram há cerca de 5000-6000 anos (Holoceno) sobre o efeito do clima, solo e homem (Bradshaw *et al.*, 2000; Hurme *et al.*, 2000; Blondel, 2006; Schmidting, 2007), mas também da hibridação formando novas linhagens (Mir *et al.*, 2006). A composição, distribuição e estrutura são variáveis entre os grupos e entre as espécies do mesmo grupo e em função da altitude, latitude e exposição:

### **2.1.1. Grupo de espécies de folhagem persistente**

O grupo esclerófilo é composto por 4 espécies (*Q. ilex/rotundifolia*, *Quercus suber*, *Q. coccifera*, *Q. calliprinos*) que ocupam os estratos termomediterrânico e mesomediterrânico húmidos e sub-húmidos (Quézel e Bonin, 1980; Timbal e Aussenac, 1996). Em conjunto, estes ecossistemas constituíam um cordão descontínuo à volta de todo o mediterrâneo, excepto as planícies xerotérmicas a Leste (Líbia-Egipto) e a Oeste (Souss em Marrocos) correspondentes aos corredores das influências tropicais e do deserto (FAO/UNESCO, 1963), e é principalmente representado pelo azinho (65000 km<sup>2</sup>) e pelo sobreiro (25000 Km<sup>2</sup>) de distribuição mais ocidental.

Quanto a estrutura, o azinho apresenta-se com ambas as formas; arbórea muito aberta nas médias altitudes (500-900 m) e arbustiva muito densa nas altas altitudes (2500-2800 m, Atlas). O *Q. coccifera* e *Q. calliprinos*, espécies dos solos esqueléticos junto ao litoral e das médias altitudes dos Balcãs, é exclusivamente arbustiva (Paffetti *et al.*, 2000). No caso do sobreiro, espécie exclusivamente arbórea, os povoamentos apresentam-se com 2 principais estruturas: i)- estrutura aberta sem sob-coberto como é o caso dos “montados/dehesas” na Península Ibérica (30-80 árvores/Ha) proveniente das actividades agroflorestais ou com um sob-coberto muito denso de *Erica sp.*, *Cistus sp.*, *Cytisus sp.* (Verdú *et al.*, 2007; Coca e Pausas, 2009; Guzmán e Vargas, 2009) proveniente dos incêndios repetitivos e ii)- estrutura densa comumente designada por sobreirais com mais de 150 árvores/Ha e sem significativa perturbação.

Todos os estudos corroboram que, para além do efeito edafoclimático (Hees, 1997; López *et al.*, 1998; Gómez-Aparicio *et al.*, 2008; Rubio *et al.*, 2010), o Homem é o factor determinante na distribuição das espécies persistentes (Pausas *et al.*, 2006; Verdú *et al.*, 2007; Blondel, 2008; Pausas e Keely, 2009) e que o sobreiro, cuja origem remonta ao período do Terciário (Toumi e Lumaret, 1998), é uma das espécies que evoluiu com o fogo (Carrion, 2000), daí a sua particular resistência (presença da cortiça). Vários estudos (Aussenac e Valette, 1982; Chaves *et al.*, 1995; Faria *et al.*, 1996 e 1998; Peñuelas e Llusà, 1999; Cherbuy *et al.*, 2001; Valladares *et al.*, 2002; Passarinho *et al.*, 2006; Grant *et al.*, 2010) indicam que o sobreiro e o azinho possuem mecanismos de adaptação que lhes permite resistir ao período crítico do Verão.

### **2.1.2. Grupo de espécies de folhagem caduca**

Este grupo, designado por caducifólia ou decídua, é representado por mais de 25 espécies que vegetam no estrato supra-mediterrânico relativamente húmido e frio, acima do limite superior das persistentes e junto dos ecossistemas frágeis das folhosas caducifólias (*Fagus sylvatica*, *Quercus petraea*, *Q. robur*) e das coníferas (*Cedrus sp.*, *Pinus nigra*, *P. sylvestris*, *Picea abies*) de altas latitudes e altitudes (Quézel, 1981; Blondel e Aronson, 1999, Bradshaw *et al.*, 2009). A sua distribuição é alargada para algumas espécies (*Q. pyrenaica*, *Q. frainetto*) e reduzida para outras (endemismo) (*Q. afares*, *Q. gussonei*, *Q. pseudocerris*) (Quézel e Bonin, 1980; Barbero e Quézel, 1989; Pantera *et al.*, 2008).

Perante uma menor pressão humana nestas altas altitudes e as condições edafoclimáticas favoráveis (solo profundo, alta humidade) à regeneração natural, a estrutura destes ecossistemas é exclusivamente arbórea e muito densa.

Em termos de adaptação, estudos (Chalabi e Serre-Bachet, 1981; Messaoudène e Tessier, 1991; Lebourgeois *et al.*, 2004) indicam que as espécies caducifólias são principalmente controladas pelo clima e muito sensíveis às variações das precipitações e das temperaturas do mês mais frio do ano (m °C). Outros estudos comparativos das relações hídricas e das respostas fisiológicas (condutância estomática) (Acherar e Rambal, 1992; Mediavilla e Escudero, 2003) revelam que a condutância estomática das espécies caducifólias permanece alta mesmo nas condições de secura, o que explica uma ineficácia do uso de água em comparação com as espécies persistentes.

## 2.2. Principais características da biologia das sementes de Quercíneas

O conhecimento da biologia da semente das espécies de reprodução seminal, como é o caso das Quercíneas, é fundamental para a adequação das técnicas da sua manipulação (colheita, tratamentos, conservação) e de produção de plantas de forma a assegurar o sucesso da regeneração artificial (Schmidt, 2000). Os eventos envolvidos na formação (floração, fecundação), maturação, disseminação e germinação da semente são inúmeros, complexos e, ainda, mal conhecidos nas Quercíneas em geral (Bonner e Vozzo, 1987; Cecich e Sullivan, 1999; Cavallaro *et al.* 2006) e no sobreiro em particular (Bueno *et al.*, 1992; Merouani, 1996; Boavida *et al.*, 1999 e 2001).

Segundo as características das suas sementes, o género *Quercus* é subdividido em 2 subgéneros (*Lepidobalanus* e *Erythrobalanus*) cujas principais diferenças sumarizadas no quadro a seguir:

<b>Características</b>	<b><i>Lepidobalanus</i> ou <i>Leucobalanus</i></b> (red ou black oak, do inglês): <i>Q. robur</i> , <i>Q. nigra</i> , <i>Q. petraea</i> , <i>Q. coccifera</i> .	<b><i>Erythrobalanus</i></b> (white oak, do inglês): <i>Q. pedunculata</i> , <i>Q. sessiliflora</i> , <i>Q. ilex/rotundifolia</i> , <i>Q. suber</i>
Tempo de maturação (Anos)	2 anos (bienal)	1 ano
Teor de água (% peso fresco)	40	50-55
Lípidos (% peso seco)	10-20	1-9
Hidratos de carbono totais (% peso seco)	23-46	34-56
Dormência primária (Tempo de estratificação)*	Profunda (30-90)	Ligeira (7-30)
*: Dias de estratificação à 2-4 °C necessários para a quebra da dormência		
Referências: Bonnet-Masimbert, 1984; Bonner e Vozzo, 1987; Dey, 1995; Rababah <i>et al.</i> , 2008		

No entanto, outras características são comuns a ambos os subgéneros e são particularmente responsáveis da limitação da disponibilidade temporal das sementes e da sua qualidade inicial, condição primordial e inequívoca para garantir o sucesso da conservação ao longo prazo.

### **2.2.1. Maturação e estado sanitário da semente**

Côme (1974) distingue dois aspectos da maturação da semente: um aspecto morfológico que se caracteriza pelas alterações da cor do pericarpo, do tamanho e do teor de água e um aspecto fisiológico que corresponde as modificações na composição bioquímica e hormonal da semente. O tamanho e o peso húmido das bolotas aumentam constantemente de Junho até Agosto. O teor da água de bolota começa a diminuir no final de Agosto e rapidamente ao longo de Setembro até Outubro. A partir de Setembro, o peso seco da bolota continua de aumentar, enquanto que o peso húmido permanece estável devido à diminuição do teor de água. Durante o rápido declínio do teor da água (Setembro-Outubro), a cor do pericarpo muda de verde para castanho. O teor dos hidratos de carbono solúveis aumenta progressivamente durante Julho até o início de Setembro para depois decrescer drasticamente e converterem-se na sua forma insolúvel, principalmente o amido (e.i. Bonner e Vozzo, 1987).

No momento da maturação, as sementes de todas as espécies do género *Quercus* apresentam agentes patogénicos, nomeadamente os insectos das diferentes famílias (*Curculionidae*, *Tortricidae* e *Cynipidae*) (Olivier e Chapin, 1984; Kaushal e Kalia, 1989; Fukumoto e Kajimura, 2000) e os fungos, principalmente o *Ciboria bastchiana* (Delatour e Morelet, 1979).

### **2.2.2. Vulnerabilidade das sementes**

Contrariamente as sementes ortodoxas cuja humidade à maturidade muito baixa (15%) e que toleram uma desidratação até níveis de 10% e se conservam muito facilmente durante longos períodos, as sementes do género *Quercus* são fortemente hidratadas (25-50%), muito sensíveis à desidratação e de difícil conservação (Bastien, 1992; Finch-Savage, 1992; Connor e Sowa, 2002), daí a sua designação de sementes recalcitrantes (Robert, 1973). Uma vez que a água é um componente importante nas reacções bioquímicas das sementes recalcitrantes, a sua desidratação além de um certo limite provoca uma alteração profunda do metabolismo e da estrutura das membranas e das proteínas e, conseqüentemente, a morte das células (Carpenter e Crowe, 1988; Vertucci e Farrant, 1995; Leprince *et al.*, 1999; Vertucci e Farrant, 1995). Todavia, a sensibilidade à desidratação das sementes varia consideravelmente entre espécies, isso devido a variação da

actividade metabólica de cada semente e da protecção contra os danos potenciais (e.g. Walters, 2000).

O impacto biológico é também penalizante nas sementes de Quercíneas em geral com a proliferação dos fungos (Delatour *et al.*, 1982; Schröder, 2002), a actividade das larvas do *Curculio* (Olivier e Chapin, 1984; Fukumoto e Kajimura, 2000) e o seu consumo pelos potenciais predadores (ratos, javalis, gado) (Loftis e McGee, 1993; Gómez *et al.*, 2003; Pausas *et al.*, 2009) as principais características responsáveis da perda da produção anual. A proliferação dos fungos durante a conservação ao frio é um problema antigo (Bonnet-Masimbert e Muller, 1973; Bonnet-Masimbert *et al.*, 1977; Delatour, 1978) e torna-se frequente e intenso nos últimos anos (Schröder, 2002).

### **2.2.3. Irregularidade de produção de semente**

A produção de sementes das Quercíneas é irregular, a um ano de “boa safra” podem seguir vários anos de “má safra” (Natividade, 1950; Olson, 1973; Sork e Bramble, 1993; Gracia *et al.*, 2001). Rohmeder, (1972), citado por Bonfils *et al.*, (2003), distingue 4 intensidades de frutificação:

- i)- Frutificação completa:* presença das sementes em todas as árvores, mesmo as árvores dominadas,
- ii)- Meia-fructificação:* presença das sementes na maioria das árvores de bordura e em algumas árvores dominantes do interior do povoamento,
- iii)- Frutificação parcial:* presença das sementes em algumas árvores de bordadura e apenas nas árvores dominantes do interior do povoamento,
- iv)- Ausência de frutificação:* ausência total das sementes e ocorre frequentemente após fortes geadas durante a fase de floração. Em 10 anos de observações, o mesmo autor registou, em média, 1 frutificação completa, 1 meia frutificação, 4 frutificações parciais e 4 anos com ausência de frutificação.

Embora o potencial de produção seja controlado geneticamente (Dey, 1995), a produção anual depende das condições climáticas, do local, da existência e actividade dos insectos e das características da árvore (idade, sanidade) (Dey, 1995). O estudo conduzido sobre o sobreiro (Boavida *et al.*, 1999) revela que o aborto ovular é frequente durante a fase de fecundação e apenas um óvulo vence com êxito em semente durante o Outono.

### **2.3. Problemas da floresta “*eu-mediterrânica*”**

A floresta da região “*eu-mediterrânica*” tem sido confrontada com um conjunto de problemas que comprometem a perenidade dos seus ecossistemas nativos e a sustentabilidade de toda a região com riscos acrescidos no futuro próximo (Santos e Miranda, 2006; Gao e Giorgi, 2008; Gaucherel *et al.*, 2008).

#### **2.3.1. Degradação dos ecossistemas**

A estrutura actual da região “*eu-mediterrânica*” está profundamente alterada levando a um estado inquietante de degradação nas médias altitudes (Barbero *et al.*, 1990; van Andel *et al.*, 1990; Bou Kheir *et al.*, 2001) e atinge mesmo as altas altitudes e latitudes (Rock *et al.*, 2004; Madsen e Löf, 2005; Messaoudène *et al.*, 2007). A degradação é um processo antigo (Holoceno), gradual e principalmente imputada às actividades do homem, nomeadamente o uso do solo para a agricultura, o fogo, a pastagem (Barbero *et al.*, 1990; Corvol-Dessert, 2004; Butzer, 2005; Touflan e Talon 2008; Hajar *et al.*, 2010). Como consequências, uma perda drástica da biodiversidade (SCBD, 2001; Salvati *et al.*, 2008), uma alteração das propriedades físico-químicas do solo (Montès *et al.*, 2004; Certini, 2005; Kosmas *et al.*, 1997) e uma perturbação da actividade biológica, nomeadamente a redução da avifauna (Moreira *et al.*, 2003; Herrando *et al.*, 2003; Blondel, 2008), o aumento dos roedores (Khidas, 1993; Kaynaş *et al.*, 2002), o aumento dos insectos xilófagos (Rouault *et al.*, 2006) e a redução da composição fúngal do solo (de Román e de Miguel, 2005; Kipfer *et al.*, 2010).

Actualmente, depara-se com a agonia de declínio da floresta nativa em geral (Delatour, 1983) com uma intensidade acrescida nos ecossistemas de sobreiro (Cabral *et al.*, 1992; Villemant e Sousa, 2002; Villemant e Ben Jamãa, 2005). Em Portugal por exemplo, a perda de vitalidade do montado aumentou significativamente à partir de 1997 atingindo uma taxa de 30% das árvores danificadas no ano de 2004 (DGRF, 2006) ou seja um aumento de 20% em apenas 7 anos dos quais 15% entre 2002 e 2004, o que poderá significar o impacto negativo dos incêndios na dinâmica das populações nocivas. As causas do declínio são inúmeras, mas o impacto biológico (insectos, fungos patogénicos) representa o factor inequívoco (Villemant e Sousa, 2002; Santos, 2003; Villemant e Ben Jamãa, 2005).

### **2.3.2. Deficiência de regeneração natural**

Sabe-se que a regeneração natural das Quercíneas é em geral problemática (Natividade, 1950; Loftis e McGee, 1993; Merouani, 1996; Acácio *et al.*, 2007; Negi *et al.*, 1996; Harrington e Kallas, 2002) e atribuída com um conjunto de factores: uns intrínsecos e relacionados com a irregularidade de produção de sementes (Natividade, 1950; Olson, 1973; Sork e Bramble, 1993; Gracia *et al.*, 2001) e a sua vulnerabilidade (semente recalcitrante, Robert, 1973) e outros extrínsecos e relacionados com a meteorologia e perturbações do funcionamento dos ecossistemas (Gondard *et al.*, 2003; Pausas e Keely, 2009), nomeadamente o aumento das populações dos potenciais predadores (naturais ou domésticos) (Kaynaş *et al.*, 2002; Gómez *et al.*, 2003) e a redução dos dispersores (Moreira *et al.*, 2003; Herrando *et al.*, 2003; Blondel, 2008), mas também a competição da vegetação herbácea (Becker e Lévy, 1983; Frochot *et al.*, 1986; Dobrowolska, 2006).

### **2.3.3. Ineficácia da regeneração artificial**

A regeneração artificial do sobreiro é um processo antigo na região mediterrânica (Boudy, 1950; Natividade, 1950; Vareta, 1985; Benzyane, 1998; Pausas *et al.*, 2009) e sofreu grandes transformações à partir dos anos 90 (EEC, 1992; Pausas *et al.*, 2004; DGRF, 2006), quer em termos do aumento da taxa e da área de reflorestação quer em termos das práticas silvícolas, mas como é sabido os resultados são ineficazes. De facto, logo a instalação, as mortalidades são elevadas no caso das sementeiras tradicionais (Natividade, 1950; Messaoudène, 1984; Sondergaard, 1991). Raros são os povoamentos que vingam e quando este acontece os prejuízos de condução (desbaste, podas) tornam-se insuportáveis devido a densidade inicial (2-5 sementes/cova, compasso apertado), mas também ao seu poder de rebentação após o corte. Apesar do recente recurso às plantações (EEC, 1992; Ciccarese *et al.*, 2001; DGRF, 2006) e da introdução de novas práticas silvícolas, nomeadamente a associação com os pinheiros (Pausas *et al.*, 2004), a preparação do terreno (e.g. Bócio *et al.*, 2004), a protecção da planta (e.g. Dias *et al.*, 1992), os resultados permanecem insatisfatórios na maioria das instalações. Uma avaliação da aplicação de programas de apoio à floresta na região do Algarve (Sul de Portugal) revela que as mortalidades das plantas são superiores à 50% logo após o primeiro ano de plantação (Louro, 1999). Também, devido aos frequentes excessos na preparação do terreno (mobilização total do solo, valas e câmoros), os custos das instalações e

pós instalação e riscos ambientais (erosão) são elevadíssimos, o que gerou o sentimento de desânimo que se tem verificado.

O debate sobre as causas da ineficácia de regeneração artificial das espécies florestais em geral tem sido contínuo desde há muito anos e identificou um conjunto de factores intrínsecos e extrínsecos que actuam negativamente na viabilidade e germinação da semente e no desenvolvimento futuro da planta. Para além das condições edafoclimáticas e biológicas do terreno e da inadequação das práticas silvícolas, a fraca qualidade do material florestal de reprodução habitualmente utilizado (MFR convencional: semente fresca e planta produzida desta) é apontada como a causa principal (Mattsson, 1996; Tinus, 1996; McKay *et al.*, 1999; O'Reilly *et al.*, 1999; Ciccarese *et al.*, 2004; Villar-Salvador *et al.*, 2004). De facto, a dificuldade germinativa das sementes frescas resultante da existência da dormência primária, característica fisiológica bem conhecida nas Quercíneas (Aissa, 1983; Bonner e Vozzo, 1987; Viswanath *et al.*, 2002; Cavallaro *et al.*, 2006) associada a uma forte predação (semente apetitosa) e a uma rápida perda de viabilidade (semente recalcitrante) são os factores prejudiciais das sementeiras. No caso das plantações, o fraco potencial de crescimento das raízes da planta (PCR) no momento da sua instalação representa o factor principal dos insucessos (Hunt *et al.*, 2002; Villar *et al.*, 2004). Este fraco PCR é resultante do elevado tempo de permanência no viveiro (TPV ou idade) em contentor de volume convencional de 300 cm<sup>3</sup> (TPV<sub>300 cm<sup>3</sup></sub> > 9 meses).

## Referências

- Acácio, V., Holmgren M., Jansen P.A. and Schrotter O. 2007. Multiple Recruitment Limitation Causes Arrested Succession in Mediterranean Cork Oak Systems. *Ecosystems*, 10: 1220–1230
- Acherar, M. and Rambale S. 1992. Comparative water relations of four Mediterranean oak species. *Vegetatio* 99-100: 177-184
- Aissa, D. 1983. Etude sur la germination des semences de chêne vert (*Quercus ilex* L.) I.- Influence de l'arbre producteur et de la taille des semences. *Revue Cytologie et Biologie Végétale et Botanique*. 5-14.
- Aussenac, G. and Valette J.C. 1982. Comportement hydrique estival de *Cedrus atlantica* Manetti, *Quercus ilex* L. et *Quercus pubescens* Willd. Et de divers pins dans le Mont Ventoux. *Ann. Sci. Forest.*, 39(1): 41-62.
- Barbero, M., Bonin G., Loisel R., and Quézel P. 1990. Changes and disturbances of forest ecosystems caused by human activities in the western part of the Mediterranean basin. *Vegetatio*. 87: 151-173.
- Barbero, M., e Quézel P. 1989. Contribution à l'étude phytosociologique des matorrals de méditerranée orientale. *Lasaroa*, 11 : 37-60.
- Bastien, Y. 1992. Résultats de semis de glands de conservation en pépinière. *Revue Forestière Française*, XLIV. 5: 430-433.
- Becker, B. and Lévy G. 1983. Installation et dynamique d'une population de semis de chêne en milieu hydromorphe sous l'influence de divers facteurs (lumière, régime hydrique, compétition herbacée). *Acta Oecologica*, 4(18) 3: 299-317.
- Benzyane, M. 1998. La subéraies marocaine: produit économique e social a développer. Actes du séminaire Méditerranéen sur la régénération des forêts de chêne liège. Tabarka, du 22 au 24 Octobre 1996, Annales de l'INRGREF, Numéro spécial: 12-21.
- Blondel, J. 2006. The 'Design' of Mediterranean Landscapes: A Millennial Story of Humans and Ecological Systems during the Historic Period. *Hum Ecol.*, 34:713–729
- Blondel, J. 2008. On humans and wildlife in Mediterranean islands. *Journal of Biogeography*, 35: 509–518
- Blondel, J. and Aronson J. 1999. Biology and Wildlife of the Mediterranean Region, Oxford University Press: Oxford.
- Boavida, L.C., Silva J.P. and Feijo J.A. 2001. Sexual reproduction in the cork oak (*Quercus suber* L.). II. Crossing intra- and interspecific barriers. *Sex Plant Reprod.*, 14:143–152
- Boavida, L.C., Varela M.C. and Feijo J.A. 1999. Sexual reproduction in the cork oak (*Quercus suber* L.). I. The progamic phase. *Sex Plant Reprod* , 11:347–353
- Bocio, I., Navarro F.B., Ripoll M.A., Jiménez M.N. and De Simón E. 2004. Holm oak (*Quercus rotundifolia* Lam.) and Aleppo pine (*Pinus halepensis* Mill.) response to different soil preparation techniques applied to forestation in abandoned farmland. *Ann. For. Sci.* 61: 171–178
- Bonfils, P., Dietiker F., Fürst E., Horisberger D., Meier S., Monnin M., Schneider P. and Walther H. 2003. La récolte de semences de chêne. proQuercus, (ed.) 2003: Le matériel forestier de reproduction du chêne, 6 p.
- Bonner, F.T. and Vozzo J. A. 1987. Seed Biology and Technology of *Quercus*. Gen. Tech. Rep. SO-66. New Orleans, LA U.S. Dept. of Agriculture, Forest Service, Southern Forest Experiment Station, 21p.
- Bonnet-Masimbert, M. 1984. Biologie florale et cycle de reproduction de quelques arbres forestiers : Douglas, pon sylvestre, chêne. In *Pesson, P e Louveaux, 1984. Pollinisation ert productivité végétale, INRA*, pp. 219-242
- Bonnet-Masimbert, M. and Muller C. 1973. La conservation des faines et des glands : recherche et perspectives. *Bull. Tech. Off. Nat. For.*, 5: 13-19
- Bonnet-Masimbert, M., Muller, C. and Morelet, M. 1977. De nouveaux espoirs pour la conservation des glands. *Bull. Tech. off Nat. For.* 9, 47-54.

- Bou Kheir, R., Girard M.-Cl., Khawlie M. and Abadallah C. 2001. Erosion hydrique des sols dans les milieux méditerranéens : une revue bibliographique. *Étude e Gestion des sols*, 8(4) : 231-245.
- Boudy, P. 1950. Economie forestière Nord- Africaine. Tome 2: Monographie e traitement des essences forestières. Fascicule I, Ed. Larose, Paris V<sup>e</sup> : 525p
- Bradshaw, R.H.W., Holmqvist B.H., Cowling S.A. and Sykes M.T.. 2000. The effects of climate change on the distribution and management of *Picea abies* in southern Scandinavia. *Can. J. For. Res.* 30: 1992–1998
- Bueno, M.A., Astorga R., and Manzanera J.A. 1992. Plant regeneration through somatic embryogenesis in *Quercus suber*. *Physiol. Plant.* 85: 30-34
- Butzer, K.W. 2005. Environmental history in the Mediterranean world: cross-disciplinary investigation of cause-and-effect for degradation and soil erosion. *Journal of Archaeological Science*, 32:1773-1800
- Cabral, M.T. , Ferreira M.C., Moreira T., Carvalho E.C and Diniz A.C. 1992. Diagnóstico das causas da anormal mortalidade dos sobreiros a sul do Tejo. *Scientia gerundensis*. 18: 205-214.
- Carpenter, J.F. and Crowe J.H. 1988. Modes of stabilization of a protein by organic solutes during desiccation. *Cryobiology*. 25: 459-470.
- Carrión, J.S., Parra I., Navarro C. and Munuera M. 2002. Past distribution and ecology of the cork oak (*Quercus suber*) in the Iberian Peninsula: a pollen-analytical approach. *Diversity and Distributions*, 6: 29–44
- Cavallaro, V. Ferrauto G., Forte L., Macchia F., Chiarelli A. and Carbonara S. 2006. Patterns and processes in forest landscapes. Consequences of human management, R. Laforzezza and G. Sanesi (eds.), AISF – Firenze, 87-93.
- Cecich, R.A. and Sullivan N.H. 1999. Influence of weather at time of pollination on acorn production of *Quercus alba* and *Quercus velutina*. *Can. J. For. Res.* 29:1817-1825
- Certini, G. 2005. Effects of fire on properties of forest soils: a review. *Oecologia* 143: 1–10
- Chalabi, M.N., and Serre-Bachet F. 1981. Analyse dendroclimatologique de deux stations syriennes de *Quercus cerris* ssp. *Pseudocerris*. *Ecologia Mediterranea* N<sup>o</sup>7 (fascicule 1): 3-21.
- Chaves, M.M., Pereira J.S., Cerasoli S., Clifton-Brown J., Miglietta F. and Raschi A. 1995. Leaf metabolism during summer drought in *Quercus ilex* trees with lifetime exposure to elevated CO<sub>2</sub>. *Journal of Biogeography*, 22: 255-259.
- Cherbuy B., Joffre R., Gillon D. and Rambal S. 2001. Internal remobilization of carbohydrates, lipids, nitrogen and phosphorus in the Mediterranean evergreen oak *Quercus ilex*. *Tree Physiology*, 21: 9-17.
- Ciccarese, L., Lucci S. and Mattsson A. 2004. Proceedings of the conference “Nursery production and stand establishment of broadleaves to promote sustainable forest management. Ed. APAT, Dalarna. Rome, Italy. 285 p.
- Ciccarese, L.; Colletti L.; Fino A. and Pettenella D. 2001. New woodland establishment in Italy: a mean to meet the Kyoto Protocol National Targets. In: “Nursery Production and stand establishment of broad-leaves to promote sustainable forest management. International Conference. Palazzo Rospigliosi, Rome –7th – 10th May, 2001. Abstract of Papers and Posters.” 56 p.
- Coca, M. and Pausas J.G. 2009. Regeneration traits are structuring phylogenetic diversity in cork oak (*Quercus suber*) woodlands. *Journal of Vegetation Science*, 20: 1009–1015
- Come, D. 1974. Quelques problèmes de terminologie concernant les semences. In Germination des semences. Eds Gauthier-Villars. Paris, pp 45-57.
- Connor, K.F., and Sowa, S. 2002. Recalcitrant behavior of temperate forest tree seeds: storage, Biochemistry, and physiology. In: Outcalt, Kenneth W., ed. Proceeding of the eleventh biennial southern silvicultural research conference, Gen. Tech. Rep. SRS-48. Asheville, NC: U.S. Dept. of Agri., Forest Service, Southern Research Station, 47-50.
- Corvol-Dessert, A. 2004. Les forêts d'occident du moyen âge à nos jours. Presses Universitaire du Mirail
- de Román, M. and de Miguel A.M. 2005. Post-fire, seasonal and annual dynamics of the ectomycorrhizal community in a *Quercus ilex* L. forest over a 3-year period. *Mycorrhiza*, 15: 471-482
- Delatour C. and Morelet M. 1979. La pourriture noire des glands. *Rev. For. Fr.* 31 : 101-115

- Delatour, C., 1978. Recherche d'une méthode de lutte curative contre le *Ciboria batschiana* (Zopf) Buchwald chez les glands. *Eur. J. For. Path.* 8, 193–200
- Delatour, C.; Muller C.; Bonnet-Masimbert M., 1982. Progress in acorns treatment in a long term storage prospect. In: IUFRO Working Party on Seed Problems. Proceedings of the International Symposium on Forest Tree Storage, September 23–27, 1980, Ed. by Wang, B. S. P.; Pitel, J. A. Petawa: *Petawa National Forestry Institute Canadian Forestry Service*, pp. 126–133.
- Delatour, C. 1983. Le dépérissement des chênes en Europe. *Revue Forestière Française* 4: 265-282
- Dey, D.C. 1995. Acorn production of red oak. Ontario Ministry of natural resources, Ontario Forest Research Institute, Sault Ste, Marie, Ontario, Forest Research information 126, 22 p.
- DGRF, 2006. Estratégia Nacional para as Florestas. Direcção Geral dos Recursos Florestais. Ministério da Agricultura, de Desenvolvimento Rural e das Pescas. 191 p
- Dias, A.S., Tomé J., Tavares P., Nunes J. and Pereira J.S. 1992. The effect of individual tree shelters in growth and morphology of cork oak seedlings. *Scientia gerundensis*, 18: 91-98
- Dobrowolska, D. 2006. Oak natural regeneration and conversion processes in mixed Scots pine stands. *Forestry*, 1-11
- EEC, 1992. Directive nº. 2080/92.
- FAO-UNESCO, 1963. Bioclimatic map of the Mediterranean zone. *Explanatory notes*. 69p
- Faria, T., Silvério D., Breia E., Cabral R.; Abadia A., Abadia J., Pereira J.S. and Chaves M.M. 1998. Differences in the response of carbon assimilation to summer stress (water deficits, high light and temperature) in four Mediterranean tree species. *Physiol. Plantarum*, 102: p. 419-428.
- Faria, T., García-Plazaola J.I., Abadía A., Cerasoli S., Pereira J.S. and Chaves M.M. 1996. Diurnal changes in photoprotective mechanisms in leaves of cork oak (*Quercus suber*) during summer. *Tree Physiol.*, 16: 115-123.
- Finch-Savage, W.E., Clay H.A. Blake P.S. and Browning G. 1992. Seed development in the recalcitrant species *Quercus robur* L.: Water status and endogenous abscisic acid levels. *Journal of Experimental Botany*, 43: 671-679.
- Frochot, H., Picard J.F. and Dreyfus Ph. 1986. La végétation herbacée obstacle aux plantations. *Revue Forestière Française*, XXXVIII 3: 271-278.
- Fukumoto, H. and Kajimura H., 2000. Effects of insect predation on hypocotyl survival and germination success of mature *Quercus variabilis* acorns. *Journal Forest Research*. 5, 31-34.
- Gao, X., and Giorgi F. 2008. Increased aridity in the Mediterranean region under greenhouse gas forcing estimated from high resolution simulations with a regional climate model gaps in knowledge and research needs. *Forest Ecology and Management* 132: 97-109
- Gaucherel, C., Guiot J., and Misson L. 2008. Changes of the potential distribution area of French Mediterranean forests under global warming. *Biogeosciences*, 5: 1493–1504
- Gómez, J.M., García D.E and Zamora R. 2003. Impact of vertebrate acorn- and seedling-predators on a Mediterranean *Quercus pyrenaica* forest. *Forest ecology and Management*, 180: 125-134.
- Gómez-Aparicio, L. Pérez-Ramos I.M., Mendoza I., Matías L., Quero J.L., Castro J. Zamora R. and Marañón T. 2008. Oak seedling survival and growth along resource gradients in Mediterranean forests: implications for regeneration in current and future environmental scenarios. *Oikos* 117: 1683-1699,
- Gondard, H., Jauffret S., Aronson J. and Lavorel S. 2003. Plant functional types: a promising tool for management and restoration of degraded lands. *Applied Vegetation Science*, 6 (2): 223-234
- Gracia M., Retana J., and Picó F.X. 2001. Seedling bank dynamics in managed holm oak (*Quercus ilex*) forests. *Ann. For. Sci.* 58: 843–852
- Grant, O.M., Tronina Ł., Ramalho J.C., Besson C.K., Lobo-do-Vale R.I., Pereira J.S., Jones H.G. and Chaves M.M. 2010. The impact of drought on leaf physiology of *Quercus suber* L. trees: comparison of an extreme drought event with chronic rainfall reduction. *Journal of Experimental Botany*, (61)15: 4361–4371

- Guzmán, B. and Vargas P. 2009. Long-distance colonization of the Western Mediterranean by *Cistus ladanifer* (Cisteaceae) despite the absence of species dispersal mechanisms. *J. Biogeogr.*, 36: 954-968.
- Hajar, L., Haïdar-Boustani M., Khater C. and Cheddadi R. 2010. Environmental changes in Lebanon during the Holocene: Man vs. climate impacts. *Journal of Arid Environments* 74: 746–755
- Harrington, C.A. and Kallas, M.A. 2002. A bibliography for *Quercus garryana* and other geographically associated and botanically related oaks. Gen. Tech. Rep. PNW-GTR-554. Portland, OR: U.S. Department of Agriculture, Forest Service, Pacific Northwest Research Station. 115 p.
- Hees, AFM van. 1997. Growth and morphology of pedunculate oak (*Quercus robur* L.) and beech (*Fagus sylvatica* L) seedlings in relation to shading and drought. *Annals of Science Forest.* 54: 9-18.
- Herrando, S., Brotons S.L. and Llacuna S. 2003. Does fire increase the spatial heterogeneity of bird communities in Mediterranean landscapes? *Ibis*, 145: 307–317
- Hunt, R., Causton D.R., Shipley B. and Askew A.P. 2002. A modern tool for classical growth analysis. *Annals of Botany.* 90: 485-488.
- Hurme, P., Sillanpää M.J. Arjas E., Repo T. and Savolainen O. 2000. Genetic Basis of Climatic Adaptation in Scots Pine by Bayesian Quantitative Trait Locus Analysis. *Genetics*, 156: 1309–1322
- Kaushal, B.R. and Kalia S., 1989: The effects of *Dicranoganathus nebulosus* (Coleoptera: *Attelabiae*) on acorns of *Quercus leucotrochophora*. *Ecol. Entomol.* 14: 239-241.
- Kaynaş, B.Y., Tavşanoğlu Ç. and Gürkan B. 2002. Species diversity of small mammals community in different stages of post-fire succession in Marmaris National Park, Turkey. *Forest Fire Research & Wildland Fire Safety*, Viegas (ed.), Rotterdam
- Khidas, K. 1993. Distribuição des roneurs en Kabylie du Djurdjura (Algérie). *Mammalia*, t. 57, nº 2: 207-212
- Kipfer, T., Egli S., Ghazoul J., Moser B. and Wohlgmuth T. 2010. Susceptibility of ectomycorrhizal fungi to soil heating. *fungus biology*, 114: 467-472
- Kosmas, C., Danalatos N., Cammeraat L.H. , Chabart M., Diamantopoulos J., Farand R., Gutierrez L., Jacob A., Marques H., Martinez-Fernandez J., Mizara A., Moustakas N., Nicolau J.M., Oliveros C., Pinna G., Puddu R., Puigdefabregas J., Roxo M., Simao A., Stamou G., Tomasi N., Usai D., and Vacca A. 1997. The effect of land use on runoff and soil erosion rates under Mediterranean conditions. *Catena* 29: 45-59
- Lebourgeois, F., Cousseau G. and Ducos Y. 2004. Climate-tree-growth relationships of *Quercus petraea* Mill. stand in the Forest of Bercé ("Futaie des Clos", Sarthe, France). *Ann. For. Sci.* 61: 361-372
- Leprince, O., Buitink J. and Hoekstra F.A. 1999- Axes and cotyledons of recalcitrant seeds of *Castanea sativa* Mill. exhibit contrasting responses of respiration to drying in relation to desiccation sensitivity. *Journal of Experimental Botany.* 50 (338): 1515-1524.
- Loftis, D.L. and McGee C.E. 1993. Oak Regeneration: Serious problems, practical recommendations. Loftis, David; McGee, Charles E. eds. Symposium Proceedings; 1992 September 8-10; Knoxville, Tennessee. 319 pp.
- López B., Sabaté S. and Gracia C. 1998. Fine roots dynamics in a Mediterranean forest: effects of drought and stem density. *Tree Physiology*, 18: 601-606
- Louro, G. 1999. Avaliação da aplicação de programas de apoio à floresta na região do Algarve. *Direcção-Geral das Florestas*. Lisboa.
- Madsen, P. and Löf M. 2005. Reforestation in southern Scandinavia using direct seeding of oak (*Quercus robur* L.). *Forestry*, 78(1): 55-64.
- Mattsson, A. 1996. Predicting field performance using seedling quality assessment. *New Forest*, 13: 227-252.
- McKay, H.M., Jinks R.L. and McEvoy C., 1999. The effect of desiccation and rough-handling on the survival and early growth of ash, beech, birch and oak seedling. *Ann. For. Sci.* 56: 391-402.

- Mediavilla, S. and Escudero A. 2003. Stomatal responses to drought at a Mediterranean site: a comparative study of co-occurring woody species differing in leaf longevity. *Tree Physiology*, 23: 987–996
- Merouani, H. 1996. Contribution à l'étude de la régénération naturelle du chêne liège (*Quercus suber* L.) : maturité e germination des glands. *Thèse de Magister*, Institut de Biologie, Université de Tizi-Ouzou, 127p.
- Messaoudène, M. 1984. Résultats des essais de semis directs du chêne liège à Melata. *Rapport interne, Institut National de Recherche Forestière (INRF-Algérie)*, pp. 10.
- Messaoudène, M. and Tessier L., 1991. Croissance radiale de *Quercus canariensis* (Willd.) et de *Quercus afares* (Pomel) dans les massifs forestiers en Kabylie (Algérie). *Ecologia Mediterranea*, 17 : 119-133.
- Messaoudène, M., Laribi M. et Derridj A. 2007. Etude de la diversité floristique de la forêt de l'Akfadou (Algérie). *Rapport Bois et Forêts des Tropiques*, 291: 75-81
- Mir C, Toumi L. and Jarne P. 2006. Endemic North African *Quercus afares* Pomel originates from hybridisation between two genetically very distant oak species (*Q. suber* L. & *Q. canariensis* Willd.): evidence from nuclear and cytoplasmic markers. *Heredity*, 96, 175–184.
- Montès, N., Ballini C., Bonin G., and Faures J. 2004. A comparative study of aboveground biomass of three Mediterranean species in a post-fire succession. *Acta Oecol.* 25: 1-6.
- Moreira, F., Delgado A., Ferreira S., Borralho R., Oliveira N., Inácio M., Silva J.S. and Rego F. 2003. Effects of prescribed fire on vegetation structure and breeding birds in young *Pinus pinaster* stands of northern Portugal. *Forest Ecology and Management*, 184: 225–237
- Natividade, J.V. 1950, *Subericultura, DGSA*, Lisboa.
- Negi, A.S., Negi G.C.S. and Singh S.P. 1996. Establishment and growth of *Quercus floribunda* seedlings after a mast year. *Journal of Vegetation Science* 7: 559-564
- O'Reilly, C., McCarthy N., Keane M., Harper C.P. and Gardiner J.J. 1999. The physiological status of Douglas fir seedlings and the field performance of freshly lifted and cold stored stock. *Ann. For. Sci.* 56: 391-402.
- Oliver, A.D. and Chapin J.B., 1984: *Curculio fluvus* (Coleoptera: Curculionidae) and its effects on acorns of live oaks, *Quercus virginiana* Miller. *Environ. Entomol.* 13: 1507-1510
- Olson, D.E.Jr. 1973. *Quercus* L. oak. In *Seeds of Woody Plant in the United States*;: 692-703. *USDA Agriculture Handbook* n° 450.
- Paffetti, D., Vettori C. and Giannini R. 2000. Relict populations of *Quercus calliprinos* Webb on Sardinia Island identified by chloroplast DNA sequences. *Forest Genetics*, 8(1): 1-11
- Pantera, A., Papadopoulos A.M., Fotiadis G. And Paranastasis V.P. 2008. Distribution and phytogeographical analysis of *Quercus ithaburensis* ssp. *macrolepis* in Greece. *ecologia mediterranea*, 34: 73-82
- Passarinho, J.A.P., Lamosa P., Baeta J.P., Santos H. and Ricardo C.P.P. 2006. Annual changes in the concentration of minerals and organic compounds of *Quercus suber* leaves. *Physiologia Plantarum*, 127: 100-110.
- Pausas, J. G., Marañón T., Caldeira M. C. and Pons J.. 2009. Natural regeneration Pages 115-124 in J. Aronson, J. S. Pereira, and J. G. Pausas, editors. *Cork Oak Woodlands on the Edge: Ecology, Adaptive management, and Restoration* Island Press washington D.C.
- Pausas, J.G. and Keeley J.E. 2009. A Burning Story: The Role of Fire in the History of Life. *BioScience* , (59) 7: 593–601
- Pausas, J.G. Bradstock R.A., Keith D.A., and Keeley J.E. 2004. Plant functional traits in relation to fire in crown-fire ecosystems. *Ecology*, 85 (4);: 1085–1100
- Pausas, J.G., Ribeiro E., Dias S.G., Pons J. and Beseler C. 2006. Regeneration of a marginal *Quercus suber* forest in the eastern Iberian Peninsula. *Journal of Vegetation Science* 17: 729-738
- Peñuelas, J. and Llusà J. 1999. Seasonal emission of monoterpenes by the Mediterranean tree *Quercus ilex* in field conditions: Relations with photosynthetic rates, temperature and volatility. *Physiologia Plantarum*, 105: 641–647.

- Quézel, P. 1981. Les hautes montagnes du Maghreb et du Proche-Orient : essai de mise en parallèle des caractères phytogéographique. *Actas III, Congr. Optima. Anales Jard. Bot. Madrid* (37): 353-372.
- Quézel, P. and Bonin G., 1980. Les forêts feuillues du pourtour méditerranéen, constitution, écologie, situation actuelle, perspectives. *Revue Forestière Française* 32 (3) : 253–268.
- Rababah, T M., Ereifej K.I., Al-Mahasneh M.A., Alhamad M.N., Alrababah M.A. and Muhammad A.H. 2008. The Physicochemical Composition of Acorns for Two Mediterranean *Quercus* Species. *Jordan Journal of Agricultural Sciences*, 4 (2): 131-137
- Roberts, E.H. 1973. Predicting the storage life of seeds. *Seed Science and Technology*. 1: 499-514.
- Rock, J., Puettmann K.J., Gockel H.A. and Schulte A. 2004. Spatial aspects of the influence of silver birch (*Betula pendula* L.) on growth and quality of young oaks (*Quercus* spp.) in central Germany. *Forestry*, 77 (3): 235-247.
- Rouault, G., Candau J.N., Lieutier F., Nageleisen L.M., Martin J.C. and Warzee N., 2006. Effects of drought and heat on forest insect populations in relation to the 2003 drought in Western Europe. *Annals of Forest Science* 63: 613–624
- Rubio, A., Merino A. and Blanco A. 2010. Soil–plant relations in Mediterranean forest environments. *Eur. J. Forest. Res.* (2010) 129:1–3
- Salvati, L. Zitti M., Ceccarelli T. and Perini L. 2008. Sensitivity to land degradation: monitoring ecological and human factors in a Mediterranean area (1970-2000). *ecologia mediterranea*, 34:53-63
- Santos, F.D. and Miranda P. 2006. Alterações climáticas em Portugal: cenários, impactos e medidas de adaptação. *Projecto SIAM II, Ed. Gravida, Lisboa* 2006. 493 p.
- Santos, M.N.S. 2003. Contribuição para o Conhecimento das Relações *Quercus suber* – *Biscogniauxia mediterranea* (syn. *Hypoxylon mediterraneum*). *Silva Lusitana* 11(1): 21 – 29
- SCBD (Secretariat of the Convention on Biological Diversity). 2001. Impacts of human-caused fires on biodiversity and ecosystem functioning, and their causes in tropical, temperate and boreal forest biomes. Montreal, SCBD, 42p. (CBDTechical Series no. 5).
- Schmidt, L. 2000. Seed storage. In " Guide to handling of tropical and subtropical forest seed". Danida Forest Seed Centre. 1-36.
- Schmidting, R. 2007. Genetic variation in the southern pines: evolution, migration, and adaptation following the Pleistocene. Proceedings of a symposium; 2006 November 7-9; Springfield, MO. Gen. Tech. Rep. NRS-P-15. Newtown Square, PA: U.S. Department of Agriculture, Forest Service, Northern Research Station: 28-32
- Schröder, T. 2002. On the geographic variation of *Ciboria batschiana* (Zopf) Buchwald, the main pathogenic fungus on acorns of *Quercus robur* and *Q. petraea* in Europe. *Dendrobiology* 47(Suppl.), 13–19.
- Sondergaard, P. 1991. Essais de semis du chêne liège *Quercus suber* L. dans la forêt de Bab-Azhar, une subéraie de montagne au Maroc. *Annales de la Recherche Forestière au Maroc*, 25 : 16-29.
- Sork, V.L. and Bramble J.E. 1993. Prediction of acorn crops in three species of North American oaks: *Quercus alba*, *Q. rubra* and *Q. velutina*. *Annals of Science Forest.* 50 (supl. 1): 128s-136s
- Tinus, R.W. 1996. Root growth potential as an indicator of drought stress history. *Tree Physiology* 16: 795-799.
- Touflan, P. and Talon B. 2008. Étude pédoanthacologique à haute résolution spatiale de l'histoire holocène d'une forêt subalpine (Alpes du Sud, France). Données préliminaires. *ecologia mediterranea*, 34: 13-23
- Toumi, L. and Lumaret R. 1998. Allozyme variation in cork oak (*Quercus suber* L.): the role of phylogeography and genetic introgression by other Mediterranean oak species and human activities. *Theoretical and applied genetics*, 97(4): 647-656.
- Valladares, F. Balaguer L., Martinez-Ferri E., Perez-Corona E. and Manrique E. 2002. Plasticity, instability and canalization: is the phenotypic variation in seedlings of sclerophyll oaks consistent with the environmental unpredictability of Mediterranean ecosystems? *New Phytologist* , 156: 457–467
- van Andel, T.H., Zangger E. and Demitrack A. 1990. Land Use and Soil Erosion in Prehistoric and Historical Greece. *Journal of Field Archaeology*, 17(4): 379-396

- Vareta, N.D. 1985. Para uma geográfica histórica da floresta portuguesa. As matas medievais e a "coutada velha" do Rei. *Revista da Faculdade de Letras. Geografia. Volume I, Porto, 47-67.*
- Verdú, M., Pausas J.G., Segarra-Moragues J.G., and Ojeda F. 2007. Burning phylogenies: Fire, molecular evolutionary rates, and diversification. *Evolution* 61(9): 2195–2204
- Vertucci, C.W. and Farrant J.M. 1995. Acquisition and loss of desiccation tolerance. *In* Seed development and germination. Eds. J. Kigel and G. Galili. New York, Marcel Dekker Inc.; 237-271.
- Villar R., Ruiz-Robledo J., Quero J.L., Poorter H., Valladores F., and Marañón T. 2004. Tasas de crecimiento en especies leñosas: aspectos funcionales e implicaciones ecológica. *Ecología del bosque mediterráneo en un mundo cambiante.* Ministério de Médio Ambiente. EGRAF, SA, Madrid: 191-227.
- Villar-Salvador, P, Planelles R., Enríque E. and Peñelas R.J. 2004. Nursery cultivation regimes, plant functional attributes, and field performances relationships in the Mediterranean oak *Quercus ilex* L. *For. Ecol. Manage.*, 196: 257-266.
- Villar-Salvador, P., Puértolas J., Peñuelas J.L. and Planelles R. 2005. Effect of nitrogen fertilization in the nursery on the drought and frost resistance of Mediterranean forest species. *Invest Agrar: Sist Recur For*, 14(3), 408-418
- Villemant, C. and Ben Jamãa M.L. 2005. Integrated Protection in oak forest. Proceeding of the IOBC working group meeting. Tunisia, 5-8 October 2004. *IOBC/wprs Bulletin* 28(8), 288p.
- Villemant, C. and Sousa E. 2002. Integrated Protection in oak forest. Proceeding of the IOBC working group meeting. Oieras, Portugal, 1-4 October 2001. *IOBC/wprs Bulletin* 25(5), 177p
- Viswanath, S., Singh R.P. and Thapliyal R.C. 2002. Seed germination patterns in a Himalayan moist temperate forest. *Tropical Ecology* 43(2): 265-273
- Walters, C. 2000. Levels of recalcitrance in seeds. *R. Bras. Fisiol. Veg.*, 12 (edição especial), 7-21.

### **3. Artigos integrantes da tese**

#### **Artigo 1.**

Merouani, H., Branco C., Almeida M.H. et Pereira J.S. 2001. Comportement physiologique des glands de chêne liège (*Quercus suber* L.) durant leur conservation et variabilité inter-individus producteurs. *Ann. For. Sci.* 58: 143-153.

#### **Artigo 2.**

Merouani, H., Branco C., Almeida M.H., and Pereira J.S. 2001. Effects of acorn storage duration and parental tree on emergence and physiological status Cork oak (*Quercus suber* L.) seedlings. *Ann. For. Sci.* 58: 543- 554.

#### **Artigo 3.**

Merouani, H., Apolinário L.M., Almeida M.H. and Pereira J.S. 2003. Maturation and acquisition of desiccation tolerance in acorns Cork oak (*Quercus suber* L.). *Seed Science and Technology.* 31: 111-124

#### **Artigo 4.**

Branco, M., Branco C., Merouani H. and Almeida M.H. 2002. Germination success, survival and seedling vigour of *Quercus suber* acorns in relation to insect damage. *Forest Ecology and Management.* 5716: 1-6.

#### **Artigo 5.**

Merouani, H, Trubat R., Lourenço M.J., Sampaio T., Santos M.L, Cortina J., Pereira J.S. and Almeida M.H. 2005. Le développement des champignons, un facteur limitant de la conservation des glands de chêne liège (*Quercus suber* L.). *Integrated Protection in Oak Forests. IOBC/wprs Bull.* 28(8): 129-136.

#### **Artigo 6.**

Merouani, H., Costa e Silva F., Sampaio T., Lourenço M.J., Faria C., Pereira J.S. and Almeida M.H. 2005. Efeito da idade e da fertilização na qualidade das plantas do sobreiro (*Quercus suber* L.) em viveiro. *5ª Congresso Florestal "A Floresta e as gentes", Instituto Politécnico de Viseu (Portugal), 16-19 Mai 2005*

# Comportement physiologique des glands de chêne liège (*Quercus suber* L.) durant leur conservation et variabilité inter-individus producteurs

Hachemi Merouani\*, Carmen Branco, Maria Helena Almeida et João S. Pereira

Instituto Superior de Agronomia, Departamento de Engenharia Florestal, Tapada da Ajuda, 1399 Lisboa Codex, Portugal

(Reçu le 3 janvier 2000 ; accepté le 29 mars 2000)

**Résumé** – Des glands mûrs ont été séparément récoltés sur 12 arbres sélectionnés dans un peuplement de chêne liège situé au Sud du Portugal (Herdade da Palma). Après ressuyage, les glands sont conservés dans 3 types de sacs (2 en polyéthylène de 30 µm et 50 µm d'épaisseur et 1 en plastique avec mailles) durant 6 mois à 0 °C. Au moment de la dissémination, les glands de la plupart des arbres du même peuplement sont dans un même état de maturité morphologique et physiologique. Leur teneur en eau oscille entre 44 % et 47 % et leur taux final de germination est supérieur à 92 %. À la récolte, la germination est très lente en raison de l'existence d'une dormance embryonnaire qui semble dépendre de l'arbre producteur. Cette germination s'améliore durant la conservation traduisant une levée progressive de la dormance. Le temps moyen de germination est d'environ 10 jours pour les glands frais et n'est que de 4 jours après 6 mois de conservation. Une relation entre la viabilité des glands et leur teneur en eau a été observée. Le temps moyen de germination des glands ressuyés ou celui des glands conservés 4 mois dans les sacs à mailles est d'environ 13 jours. Cependant, une teneur en eau inférieure à 30 % est préjudiciable à la germination des glands.

**conservation / germination / teneur en eau / pertes d'électrolytes / semence / *Quercus suber***

**Abstract** – Physiological behaviour of cork-oak acorns (*Quercus suber* L.) during storage and variation between trees. The mature acorns were harvested on twelve selected trees from a cork oak population in Southern Portugal (Herdade da Palma). After drying, the seed lots were stored on three types bags (polyethylene with 30 µm and 50 µm thick and plastic mesh), for six months at 0 °C. At the time of natural dissemination, the acorns from the majority of the trees from the same population were under the same state of morphological and physiological maturity. The moisture content was about 44–47% and a germination rate above 92%. At this time, the germination was very slow because of the existent embryonic dormancy that seems to be dependent on the individual trees. During the storage, germination rate is improved. This might be explained by the breaking dormancy during storage. The mean germination time was on an average 10 days for fresh seeds and decreased to about 4 days after 6 months storage. A relationship between viability and seed moisture content was observed. The Mean Germination Time of dried seed and stored seed for 4 months in plastic mesh bag increased to about 13 days. The germination capacity was strongly decreased when the seed moisture content was below 30%.

**storage / germination / moisture content / electrolyte leakage / seed / *Quercus suber***

---

\* Correspondance et tirés-à-part  
Tel. +351 21 365 33 84 ; Fax. +351 21 364 50 00 ; e-mail: hmerouani@isa.utl.pt

## 1. INTRODUCTION

L'aire des suberaies portugaises a augmenté de 8.5 % durant ces 10 dernières années due à une forte reforestation (80 000 hectares) financée par des projets de l'UE (EEC Reg. 797/95 et 2080/92). Les suberaies jouent des rôles écologiques et socio-économiques considérables. Cependant, le recours à leur régénération par plantation, est aujourd'hui une nécessité.

L'irrégularité des glandées et les grandes pertes de glands frais, occasionnées avant leur utilisation (dessèchement) mais aussi leur germination difficile et très étalée dans le temps (dormance embryonnaire), imposent la conservation des glands pour permettre une germination plus groupée et un approvisionnement annuel des pépinières en glands. Bastien [2] conclut, pour 2 autres espèces de chênes (rouvre et pédonculé) que la conservation est le seul moyen de répondre à cette problématique.

Pour de nombreuses espèces, il existe une relation directe entre l'état morphologique des semences (taille/poids) et leur capacité germinative [4]. Aissa [1] montre que la dormance initiale des glands de chêne vert est fonction de l'arbre producteur mais aucune relation n'a été trouvée entre la taille (ou le poids) des glands et leur germination.

Des études [2, 3, 13, 25] rapportent que les glands du genre *Quercus* sont difficiles à conserver. Il n'existe aucun protocole standard pour la conservation à long terme des semences récalcitrantes ou intermédiaires, à l'exception de quelques succès obtenus avec la cryopreservation sur *Araucaria hunsteinii* [19]. La difficulté réside dans la maîtrise de la teneur en eau des glands durant la conservation : à teneur en eau élevée (teneur en eau initiale), les glands germent et une forte déshydratation peut entraîner leur mort. La viabilité des glands de *Quercus macrocarpa* conservés à  $-2^{\circ}\text{C}$  et  $1^{\circ}\text{C}$  est significativement affectée par leur teneur en eau avec un optimum de germination à 44 % et un minimum à 27 et 17 % [20]. Grange et Finch-Savage [10], Finch-Savage [9], Hendry et al. [11] notent une teneur en eau optimale de 40 % et un seuil létal de 20 % pour les glands de *Quercus robur*. Pour maintenir la viabilité et éviter la germination précoce des glands durant la conservation, un ressuyage préalable est nécessaire [1]. Des pertes de l'ordre de 5 à 10 % semblent adéquates pour les chênes méditerranéens [5].

Nous proposons donc d'étudier les effets de la conservation au froid humide sur le comportement germinatif des glands de chêne liège en relation avec leur état hydrique et les pertes des électrolytes des embryons et sa variabilité inter-individus échantillonnés.

## 2. MATÉRIEL ET MÉTHODES

### 2.1. Matériel végétal

Des échantillons de glands frais (un minimum de 1300 glands), morphologiquement mûrs, ont été séparément récoltés fin novembre 1998 sur 12 arbres sélectionnés dans un peuplement de chêne liège de structure pâturage situé au Sud du Portugal (Alcácer do Sal/Herdade da Palma,  $38^{\circ}33' \text{N}$ ,  $8^{\circ}42' \text{W}$  ; 73–76 m d'altitude ; 566 mm de précipitation moyenne annuelle et  $16,4^{\circ}\text{C}$  de température moyenne annuelle).

Après triage et nettoyage, les glands issus de chaque arbre sont ressuyés pendant une semaine à  $20^{\circ}\text{C}$  puis enrobés dans un fongicide (thirame,  $1,5 \text{ g kg}^{-1}$ ) et immédiatement conservés dans 3 types de sacs : 2 sacs de polyéthylène de 30 et  $50 \mu\text{m}$  d'épaisseur et 1 sac plastique à mailles (dans ce dernier type de sac, seuls les glands des arbres n° 3, 7 et 9, ayant produits suffisamment de glands, ont été expérimentés). La durée de conservation est de 6 mois à  $0^{\circ}\text{C}$ . Aucun traitement thermique n'a été appliqué aux glands avant leur conservation.

### 2.2. Méthodes

#### 2.2.1. Détermination de la teneur en eau

La teneur en eau des glands frais, ressuyés et chaque mois celle des glands conservés a été déterminée, pour chaque arbre, sur 10 glands pesés un à un. Leur poids sec (PS) est évalué après 17 heures à  $103^{\circ}\text{C}$  [12]. La teneur en eau, exprimée en % par rapport au poids frais (PF) des glands, a été calculée par la formule :

$$\text{H\%} = 100 \frac{(\text{PF} - \text{PS})}{\text{PF}}$$

#### 2.2.2. Technique de germination

La germination des glands frais (3 jours après leur récolte), ressuyés et mensuellement celle des glands conservés a été conduite sur des lots de 25 glands par arbre. Les glands préalablement imbibés pendant 48 heures à  $20^{\circ}\text{C}$  et stérilisés pendant 10–15 min dans une solution de chlorure de sodium (80 %) sont privés du 1/3 de leur partie basale puis mis à germer dans du sable humide à l'obscurité et à  $20^{\circ}\text{C}$  durant 28 jours. L'apparition de champignons à partir du 2<sup>e</sup> mois de conservation nous a amené à arroser le substrat de culture avec une solution de thirame ( $1,5 \text{ g l}^{-1}$ ). Un gland est considéré comme germé lorsque la radicule perce les enveloppes et manifeste son géotropisme positif.

La vitesse de germination est appréciée par le temps moyen de germination (TMG) calculé par la formule :

$$\text{TMG} = \frac{n_i \cdot t_i}{N}$$

où  $n_i$  représente le nombre de glands germés au temps  $t_i$  et  $N$  le nombre total de glands germé à la fin de l'expérience.

### 2.2.3. Mesure de l'intégrité embryonnaire

Les pertes électrolytiques des embryons [21] des glands frais, ressuyés et conservés sont déterminés en utilisant la méthode de conductivité relative. Dix embryons par arbre sont individuellement immergés dans 7,5 ml d'eau désionisée. Les pertes d'électrolytes des embryons sont déterminées par la méthode de McKay [14, 15] adaptée aux racines secondaires.

### 2.2.4. Analyses statistiques

Les analyses statistiques sont réalisées avec le logiciel « Jendel SigmaStat ». L'analyse de la variance a été faite par ANOVA. À la récolte des glands, le test de Tukey au seuil de 5 % a été utilisé pour comparer les teneurs en eau et les pertes électrolytiques des embryons. Tous les résultats, d'états hydriques et de pertes électrolytiques, obtenus pour les différents arbres durant la conservation

ont été comparés par rapport à l'état frais en utilisant le test de Dunnett.

## 3. RÉSULTATS

### 3.1. Teneur en eau

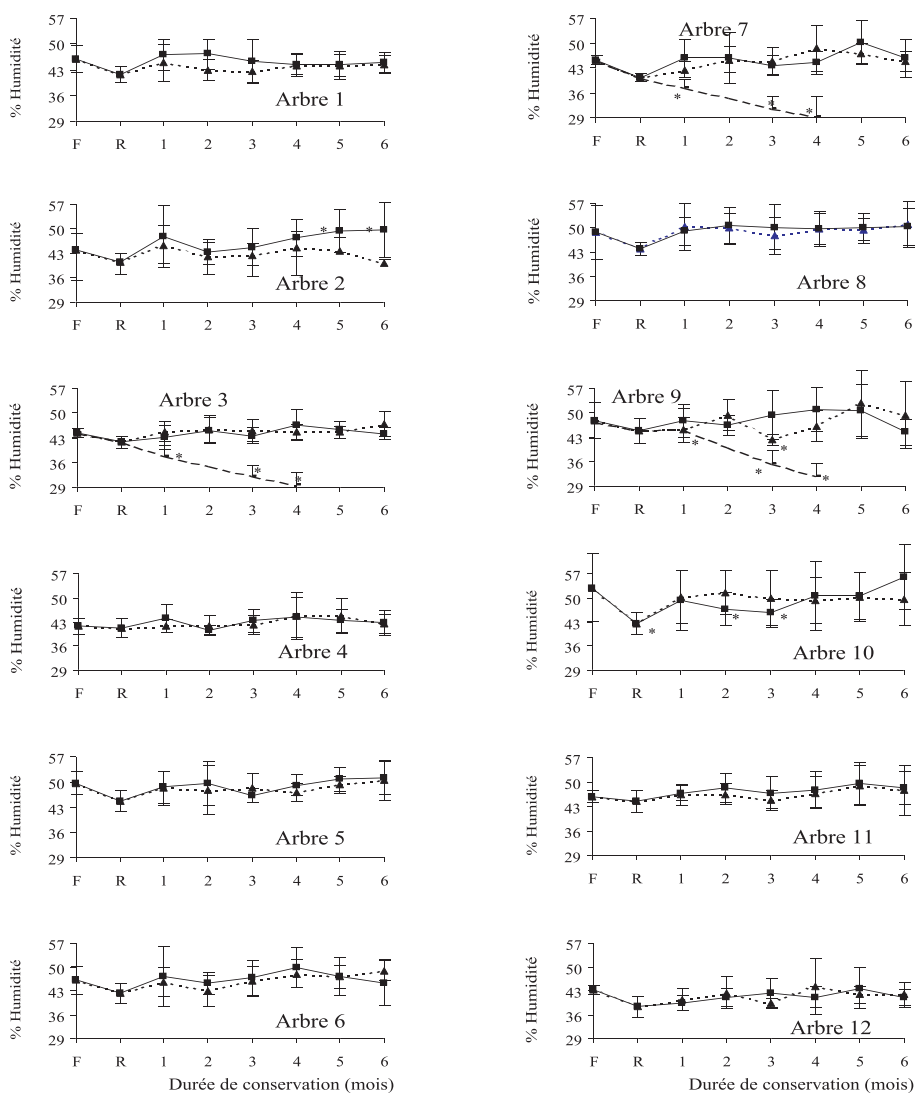
Au moment de la dissémination, 3 groupes de glands différents par leur teneur en eau se distinguent parmi les arbres échantillonnés : un premier groupe fortement hydraté (51,3 %) comprenant seulement les arbres n° 5 et n° 10, un deuxième intermédiaire (47,1 %) composé de 4 arbres et un troisième faiblement hydraté (44,1 %) correspondant au reste des arbres (*tableau I*). Seule la teneur en eau des glands des arbres du groupe 1 est significativement différente ( $P < 0,05$ ) de celle du groupe 3. Après une semaine de ressuyage, les glands montrent des pertes d'eau différentes d'un arbre à l'autre ; les glands de l'arbre n° 10 (fortement hydratés) sont ceux qui ont significativement ( $P < 0,05$ ) perdu le plus d'eau et ceux de l'arbre n° 4 (faiblement hydratés) ont perdu le moins d'eau. Ces différences dans les pertes d'eau ont alors entraîné des groupes différents, en terme de composition d'arbres de ceux de l'état frais (*tableau I*).

Au cours de la conservation, les teneurs en eau des glands varient selon le type de sac (*figure 1*). En effet, pour tous les arbres, la teneur en eau des glands

**Tableau I.** Détermination de trois groupes d'arbres en fonction de la teneur en eau initiale des glands frais et après une semaine de ressuyage à 20 °C. Mesure de la perte d'eau par rapport au poids frais.

Groupes	Arbres	Teneur en eau des glands (%) :		Pertes d'eau des glands (%)	
		frais	Arbres ressuyés		
<b>I</b>	5a	49,76 ± 3,34	9a	44,78 ± 3,71	6,3
	10a	52,84 ± 9,79	5a	44,81 ± 2,84	9,9
	<i>Moyenne</i>	51,3 ± 2,18		44,8 ± 0,02	
<b>II</b>	11ab	45,99 ± 1,72	4a	41,35 ± 2,82	1,0
	6ab	46,09 ± 3,92	1ab	41,74 ± 2,13	8,9
	9ab	47,81 ± 5,13	3ab	41,75 ± 1,79	6,3
	8ab	48,61 ± 7,91	6ab	42,22 ± 2,90	8,4
			10ab	42,63 ± 3,21	19,3
			8ab	43,99 ± 1,91	9,5
<i>Moyenne</i>		47,1 ± 1,3	11ab	44,68 ± 3,11	2,9
				42,6 ± 1,25	
<b>III</b>	4b	41,78 ± 2,43	12b	38,37 ± 3,05	9,7
	12b	43,28 ± 1,2	7b	40,34 ± 0,96	10,5
	2b	44,08 ± 4,55	2b	40,35 ± 2,79	8,5
	3b	44,56 ± 1,25			
	7b	45,05 ± 1,27			
	1b	45,84 ± 3,61			
<i>Moyenne</i>		44,1 ± 1,43		39,7 ± 1,14	

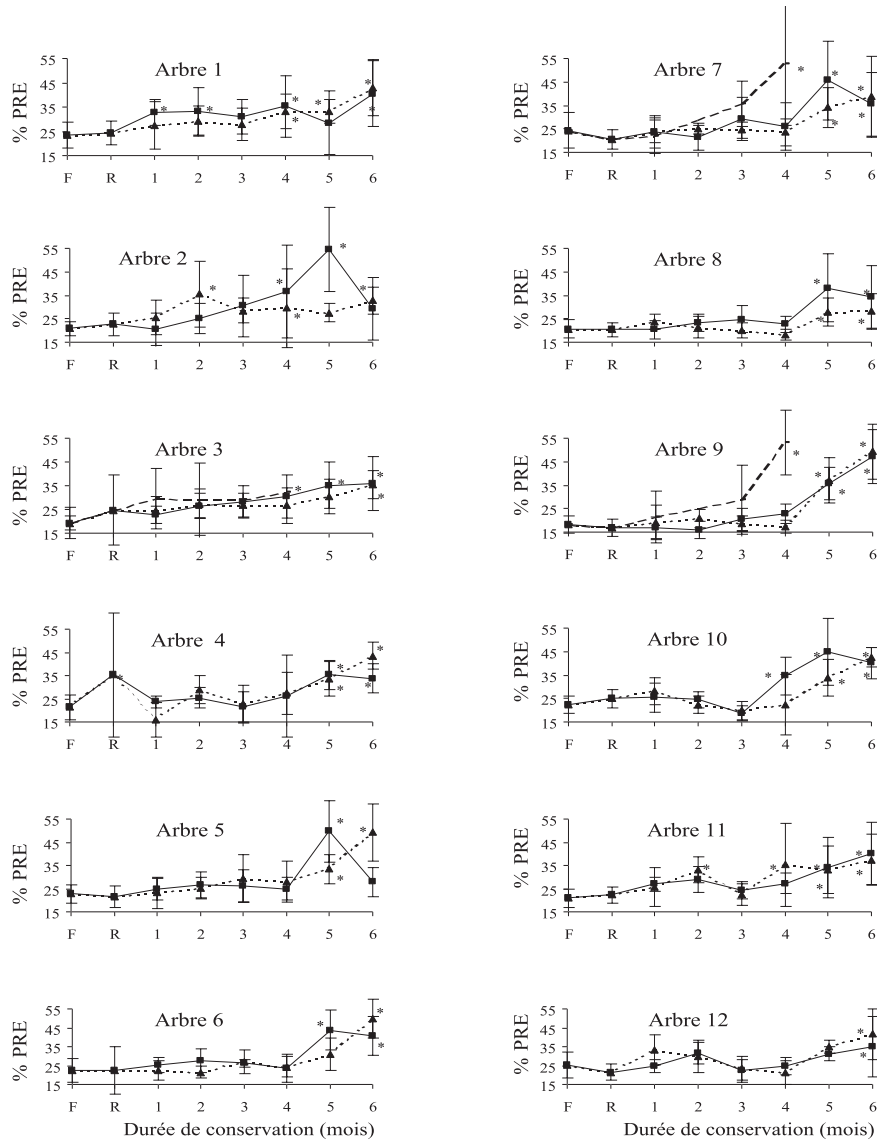
Pour la colonne arbre, une différence significative ( $P < 0,05$ ) de l'état hydrique des glands des différents arbres est observée lorsque les lettres sont différentes.



**Figure 1.** Évolution de la teneur en eau des glands fraîchement récoltés (F), ressuyés (R) et conservés durant 6 mois dans les sacs de polyéthylène 30 µm (---▲---) et 50 µm (—■—) et dans le sac plastique à mailles (---).  
 \* Différences significatives ( $P < 0,05$ ) de l'état hydrique des glands par rapport à leur état frais.

conservés dans les sacs de polyéthylène (30 et 50 µm) augmente dès le 1<sup>er</sup> mois de conservation pour atteindre un niveau proche de l'état hydrique initial (état frais) puis se stabilise durant le reste du temps de conservation. Aucune différence significative n'est observée entre l'état hydrique des glands conservés et l'état hydrique des glands frais à l'exception de celui des glands de l'arbre n° 2 (au 5<sup>e</sup> et 6<sup>e</sup> mois de conservation), de l'arbre n° 9 (au 3<sup>e</sup> mois) et de l'arbre n° 10 (au 2<sup>e</sup> et 3<sup>e</sup> mois)

(figure 1). Ces variations sont probablement dues à une condensation de l'eau à l'intérieur du sac (cas de l'arbre n° 2) et à une perforation des parois de celui-ci par les larves de *Balanus* (cas des arbres n° 9 et n° 10). Au contraire, les glands des 3 arbres conservés dans les sacs à mailles montrent des pertes significatives de leur teneur en eau dès le 1<sup>er</sup> mois et atteignent des teneurs de l'ordre de 30 % au 4<sup>e</sup> mois de conservation (figure 1).



**Figure 2.** Évolution des Pertes Relatives d'Electrolytes (% PRE) des embryons des glands fraîchement récoltés (F), ressuyés (R) et conservés durant 6 mois dans les sacs de polyéthylène 30 µm (---▲---) et 50 µm (---■---) et dans le sac plastique à mailles (---).  
\* Différences significatives ( $P < 0,05$ ) avec les pertes électrolytiques des glands frais.

### 3.2. Pertes d'électrolytes

À la récolte, les glands des différents arbres ne présentent aucune différence de l'intégrité membranaire de leur embryons ( $P=0,153$ ). Elle est de  $21,9\% \pm 2,02$  en moyenne. Après ressuyage, seuls les glands de l'arbre n° 4 montrent une augmentation significative des pertes électrolytiques ( $35,9\% \pm 26,7$ ) (figure 2). Cette augmentation des pertes membranaires, mais à variabilité impor-

tante, peut être expliquée par l'état hydrique initial très bas de certains glands.

C'est durant la conservation que les dégâts significatifs des embryons commencent à apparaître. Le moment d'apparition de ces dégâts diffère selon les arbres et selon le type de sac de conservation (figure 2). En effet, pour certains arbres (n° 1, n° 2, n° 10 et n° 11) l'altération des membranes embryonnaires des glands est plus précoce que celle du reste des arbres qui ne parvient qu'au

5<sup>e</sup> mois de conservation (*figure 2*). Il semble que l'altération membranaire est plus importante chez les glands qui sont conservés dans les sacs 50 µm.

Quant aux glands conservés dans les sacs à mailles, les pertes électrolytiques des membranes embryonnaires augmentent dès le 1<sup>er</sup> mois pour atteindre des valeurs supérieures à 40 % au 4<sup>e</sup> mois de conservation (*figure 2*).

### 3.3. Germination

Deux types de germination seront considérés : la capacité germinative à différents états physiologiques des glands (frais, ressuyé et conservé) et le pourcentage de glands germés dans les sacs pendant le processus de conservation

#### 3.3.1. Capacité germinative

Bien que le taux final de germination des glands frais des différents arbres soit supérieur à 92 % (exception faite pour ceux de l'arbre n° 12 avec 84 %), il apparaît que leur germination est très lente (*tableau II*). Certains arbres manifestent des différences significatives ( $P < 0,05$ ) dans la capacité germinative de leurs glands. En effet, les glands de l'arbre n° 4, dont la germination est la meilleure et ceux des arbres n° 10 et n° 12, dont la germination est lente se distinguent des autres. Après ressuyage, le temps moyen de germination des glands de la plupart des arbres augmente à l'exception de celui des glands des arbres n° 6 et n° 10 (*tableau II*). Les résultats

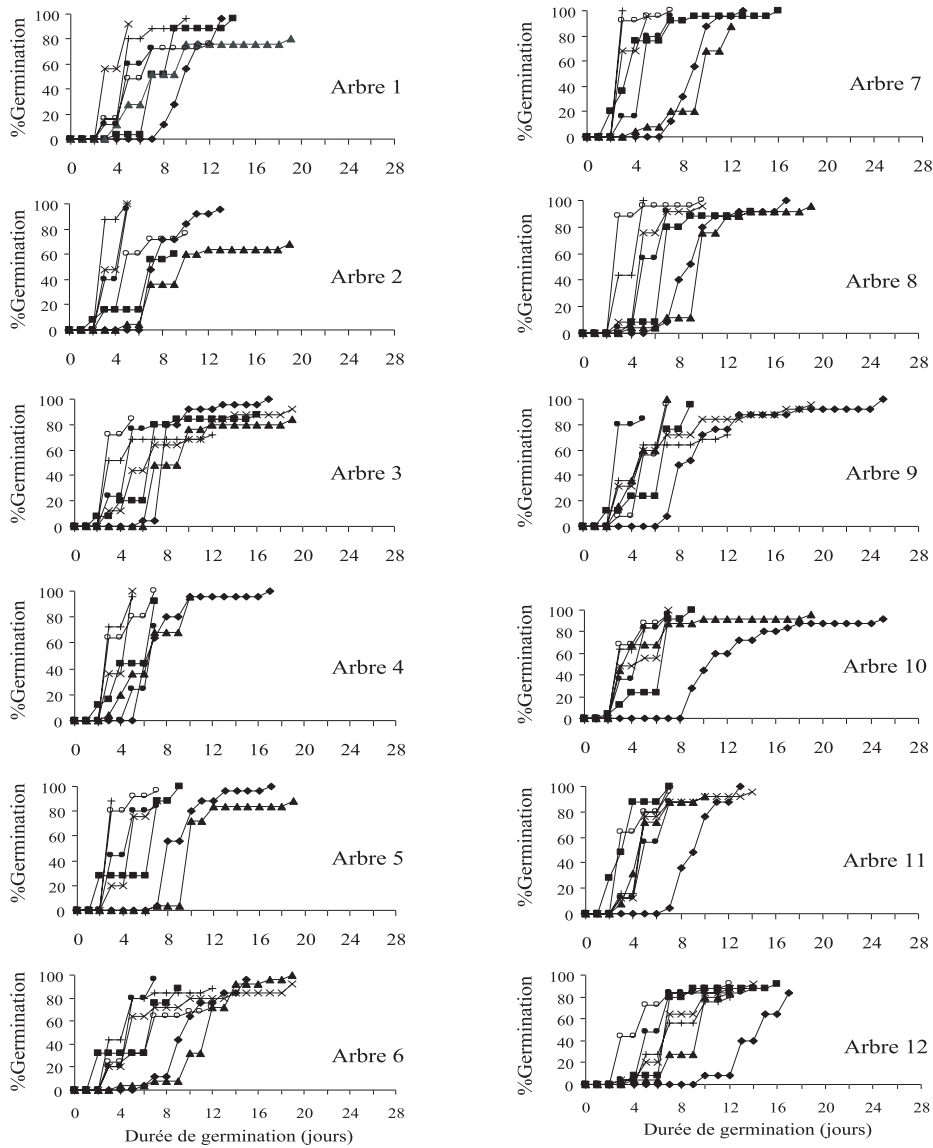
(*tableau II, figure 3, figure 4*) montrent que, d'une manière générale, la vitesse de germination des glands conservés dans les sacs de polyéthylène s'améliore progressivement. Le Temps Moyen de Germination (TMG) des glands de la plupart des arbres semble être réduit de moitié après 3 mois de conservation ; mais pour le reste, le maximum de réduction du TMG ne s'opère qu'au 4<sup>e</sup> mois (*tableau II*), moment où une baisse du taux final de germination des glands de quelques arbres est observée (*figure 3, figure 4*). Au contraire la germination des glands conservés dans le sac à mailles devient de plus en plus médiocre (*figure 5, tableau II*). Au 4<sup>e</sup> mois de conservation les glands conservés dans les sacs à mailles présentent un taux final de germination inférieur à 40 % (*figure 5*) et un TMG de 10 à 14 jours environ (*tableau II*).

#### 3.3.2. Germination durant la conservation

Au cours de la conservation, les glands entrent en germination. En effet, au 4<sup>e</sup> mois, certains glands de la plupart des arbres commençaient à germer précocement à l'intérieur des sacs de polyéthylène. Mais seuls les glands des arbres n° 5, n° 9 et n° 10 présentaient des germinations particulièrement élevées à partir du 5<sup>e</sup> mois (*tableau III*). Les autres arbres ne présentent que très peu (moins de 10 %) ou pas, de germination à la fin du processus de conservation (*tableau III*).

**Tableau II.** Temps moyen de germination des glands fraîchement récoltés, ressuyés et conservés durant 6 mois dans les sacs de polyéthylène (30 et 50 µm) et dans le sac plastique à mailles.

Arbres	Glands frais	Glands ressuyés	Mois de conservation															
			1		2		3		4		5		6					
			30	50	30	50	30	50	30	50	30	50	30	50				
			Types de sacs															
					à maille				à maille				à maille				à maille	
1	10,4	13,0	8,2	7,3		7,7	8,1	3,8	6,3		5,6	5,2		5,0	5,5	5,25	5,59	
2	8,2	9,5	5,9	6,9		8,9	8,0	4,0	9,2		5,2	5,8		4,2	4,6	3,24	5,07	
3	8,7	12,6	6,6	8,8	7,4	8,8	9,3	7,6	5,0	11,5	3,3	5,9	10,3	4,8	4,0	3,94	3,71	
4	7,6	11,4	5,3	6,7		6,9	3,8	4,3	4,0		4,1	4,8		7,1	3,5	3,5	3,96	
5	9,4	12,8	5,8	5,7		10,6	7,9	4,8	4,2		3,4	3,6		4,1	5,2	3	3,62	
6	10,3	7,5	5,5	9,5		11,9	6,4	6,8	8,1		6,5	4,5		5,1	4,9	4,41	3,74	
7	9,2	16,0	4,6	7,3	6,7	9,6	4,4	3,6	4,6	8,2	3,2	4,3	13,3	5,0	3,0	3	3,24	
8	9,7	9,9	7,2	9,4		10,3	9,1	5,4	5,1		3,4	6,3		6,0	5,8	4,12	5,32	
9	10,8	15,8	6,4	10,1	7,7	5,3	7,5	6,7	7,2	11,4	5,7	3,5	13,9	3,7	4,1	4,67	4,35	
10	12,0	8,6	6,3	7,2		5,0	6,5	4,9	4,7		3,8	4,5		4,5	3,0	3,48	3,5	
11	9,6	16,4	3,6	6,0		5,1	5,7	5,6	3,2		4,0	5,1		5,7	3,4	5,08	5,27	
12	14,2	19,8	7,3	7,8		9,4	8,8	7,7	6,8		5,3	9,6		5,8	5,9	7,3	5,25	



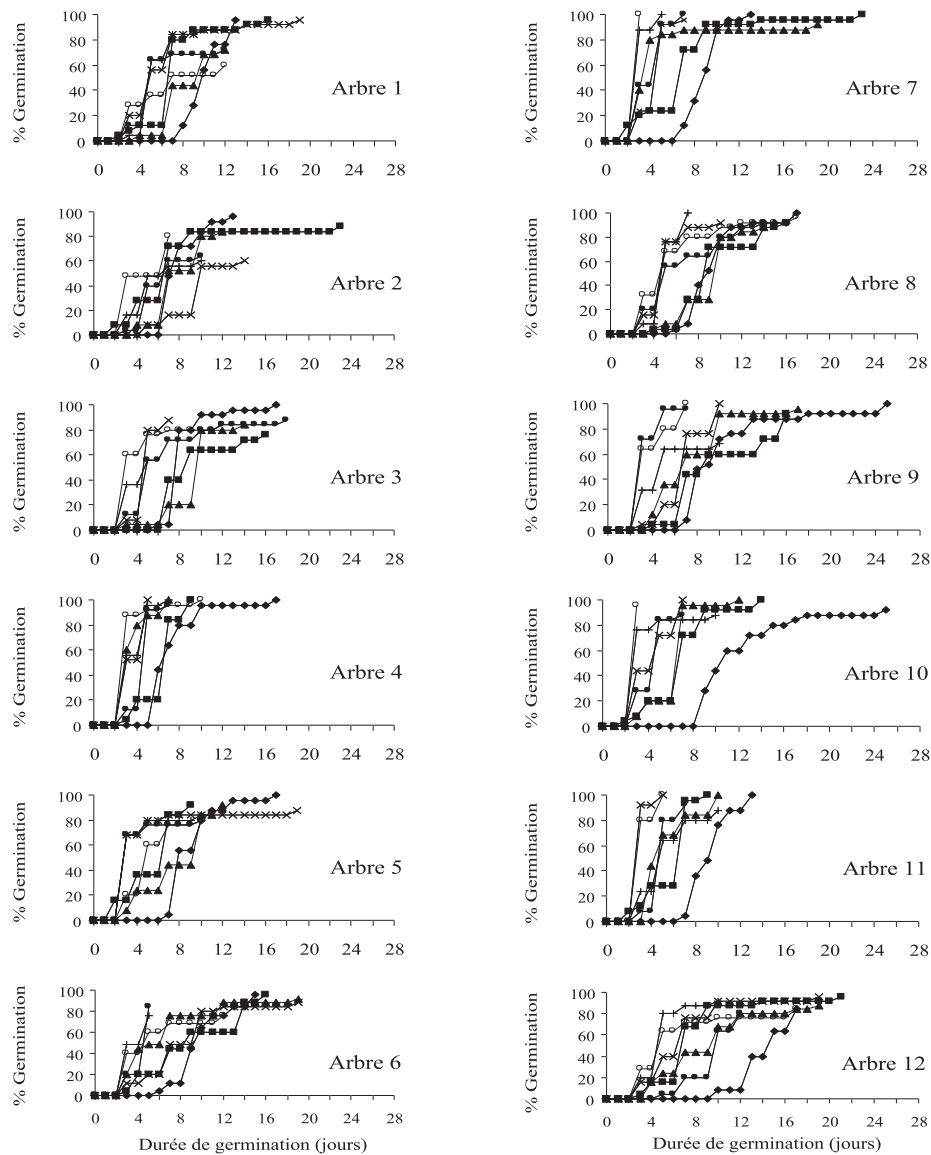
**Figure 3.** Évolution du pourcentage de germination des glands fraîchement récoltés sur les différents arbres et conservés durant 6 mois dans les sacs en polyéthylène de 30 µm d'épaisseur. (20 °C, obscurité, sable humide, durant 28 jours).

Glands fraîchement récoltés : ◆—◆  
 Mois de conservation : 1 : ■—■, 2 : ▲—▲, 3 : x—x, 4 : o—o, 5 : ●—●, 6 : +—+

#### 4. DISCUSSION

Les résultats obtenus avec les 12 arbres considérés individuellement montrent qu'au moment de la dissémination naturelle, la majorité des glands d'un même peuplement sont dans un même état de maturité morphologique et physiologique. En effet, à la récolte, les glands

avaient une teneur en eau oscillant entre 44 % et 47 % et un taux final de germination supérieur à 92 %. Néanmoins, à cette même période, les glands de certains arbres (*tableau I*) étaient apparemment immatures morphologiquement avec une teneur en eau supérieure à 51 %. Ysard [24] trouve que l'immaturité morphologique des glands des chênes pubescents et Kermès réside



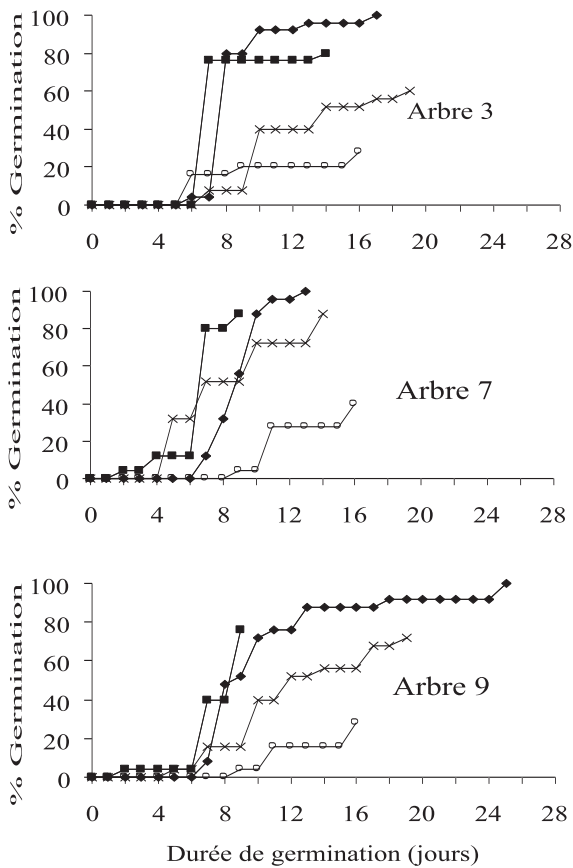
**Figure 4.** Évolution du pourcentage de germination des glands fraîchement récoltés sur les différents arbres et conservés durant 6 mois dans les sacs en polyéthylène de 50 µm d'épaisseur. (20° C, obscurité, sable humide, durant 28 jours).

Glands fraîchement récoltés : ◆—◆

Mois de conservation : 1 : ■—■, 2 : ▲—▲, 3 : x—x, 4 : o—o, 5 : ●—●, 6 : +—+

principalement au niveau des enveloppes. Cependant, l'importante teneur en eau des glands de l'arbre n° 10 (52,84%) est probablement due à une forte hydratation de leur péricarpe, ce qui expliquerait les fortes pertes d'eau (19,3%) durant la phase de ressuyage.

Une des caractéristiques physiologiques des glands mûrs fraîchement récoltés est la lenteur de leur germination. Cette difficulté germinative s'explique par l'existence d'une dormance embryonnaire qui semble dépendre de l'arbre producteur. Cette propriété physiolo-



**Figure 5.** Évolution du pourcentage de germination des glands fraîchement récoltés sur les différents arbres et conservés durant 4 mois dans les sacs en plastique à mailles. (20° C, obscurité, sable humide, durant 28 jours).  
 Glands fraîchement récoltés : ◆—◆  
 Mois de conservation : 1 : ■—■, 3 : x—x, 4 : o—o

gique liée à la plante mère a été déjà signalée pour les céréales [4], pour le chêne vert [1] et pour l'olivier [23]. Cette différence d'aptitude germinative des glands frais pourrait être une expression de l'hétérogénéité génétique puisque les arbres échantillonnés sont situés dans les mêmes conditions climatiques. Cette hétérogénéité pourrait être liée à l'immaturité physiologique des glands ou/et à l'action mécanique exercée par le péricarpe à la sortie de la radicule, traduisant de ce fait le faible taux de germination (84 %) des glands de l'arbre n° 12, et à l'état hydrique élevé des enveloppes (cas des glands de l'arbre n° 10). Les enveloppes saturées d'eau constituent une barrière limitant la respiration de l'embryon [6, 7].

Au cours de la conservation, la teneur en eau des glands conservés dans les sacs de polyéthylène augmente dès le 1<sup>er</sup> mois de conservation pour atteindre l'état hydrique initial, puis se stabilise. Au contraire, les glands conservés dans les sacs à mailles perdent progressivement leur eau et atteignent dès le 4<sup>e</sup> mois des teneurs en eau de l'ordre de 30% préjudicant ainsi leur viabilité. La vitesse de germination des glands conservés dans les sacs en polyéthylène s'améliore progressivement. La germination devient plus groupée et le temps moyen de germination de plus en plus réduit. Le traitement des glands par le froid humide élimine donc leur dormance embryonnaire qui semble être complètement levée au 3<sup>e</sup> mois de conservation pour la plupart des arbres. Les mécanismes intervenant dans ce phénomène de levée de dormance peuvent être attribués à une diminution de l'acide abscissique et à une augmentation de l'acide gibbérellique durant le processus de conservation [22].

La réussite de la conservation des glands qui consiste à éviter leur germination précoce et à maintenir leur viabilité durant tout le processus de conservation, semble compromise par deux facteurs. L'un lié à la teneur en

**Tableau III.** Pourcentage de germination précoce des glands des différents arbres, à l'intérieur des sacs de polyéthylène (30 ou 50µm) et après chaque mois de conservation.

Mois de conservation	Type de sac	Les différents arbres échantillonnés											
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
1	30	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	50	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2	30	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	50	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
3	30	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	50	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
4	30	0	0	3,1	1,5	3,1	0	1,5	0	4,6	4,6	0	0
	50	0	0	1,5	1,5	4,6	0	4,6	1,5	1,5	1,5	3,1	0
5	30	0	4,6	7,7	0	12	3,1	4,6	3,1	9	12	4,6	1,5
	50	0	1,5	6,2	0	11	4,6	7,7	0	11	15	3,1	0
6	30	0	3,1	7,8	4,6	17	9,2	7,7	0	15	14	7,7	0
	50	0	1,5	6,2	3,1	20	4,6	6,2	3,1	14	18	3,1	0

eau des glands l'autre au développement des champignons. En effet, lorsque les glands se réhydratent fortement durant la conservation, comme c'est le cas des glands des arbres n° 5, n° 9 et n° 10, ils rentrent très rapidement en germination. Ce résultat suggère que les phases d'imbibition et d'élongation cellulaire de l'embryon sont déjà accomplies durant les 3 premiers mois de conservation. Cette précocité dans la germination durant la conservation paraît être liée à l'état hydrique élevé des glands juste avant leur conservation (44 %, cas des glands des arbres n° 5 et n° 9) et à l'immaturation morphologique des glands (cas des glands de l'arbre n° 10). Muller [16] rapporte que la teneur en eau des graines et leur maturité à la récolte influent sur la longévité des semences en conservation. Un ressuyage préalable amenant les glands frais à des teneurs en eau inférieures à 42 % évite donc des germinations précoces importantes. Les différentes études [Rohmeder dans 5, 11, 16], menées sur le genre *Quercus* recommandent des teneurs en eau des glands allant de 35 % à 42 % pour réussir la conservation. Mais lorsque les pertes d'eau deviennent plus importantes et que les teneurs en eau des glands atteignent des valeurs proches de 30 %, comme c'est le cas pour les glands conservés dans les sacs à mailles (figure 1), la capacité germinative est fortement affectée. Des travaux [9, 11, 18, 20] conduits sur d'autres chênes s'accordent sur le fait que la viabilité des glands est associée à des pertes importantes d'eau. Des teneurs en eau des glands inférieures à 30 % sont usuellement létales pour le genre *Quercus* [Schopmeyer 1974 dans 17]. Jones [13] rapporte que, pour obtenir une germination optimale du chêne blanc, la teneur en eau des glands ne doit pas descendre en dessous de 30 %. La baisse de la capacité germinative des glands de certains arbres, observée particulièrement à partir du 4<sup>e</sup> mois de conservation, est due à l'expansion progressive de l'attaque des champignons. Un traitement thérapeutique [8, 16] des glands frais avant leur conservation est donc nécessaire pour lutter contre les champignons. Ces deux facteurs, déshydratation et attaque des champignons influent directement sur l'intégrité membranaire des embryons qui s'exprime par une augmentation des pertes d'électrolytes. Cependant, nous dirons que la réussite de la conservation des glands est compromise par un ensemble de paramètres dont le plus difficile est la maîtrise de la teneur en eau des glands.

En conclusion, nous dirons qu'au moment de la dissémination naturelle, la majorité des glands d'un même peuplement sont dans un même état de maturité morphologique et physiologique. Leur teneur en eau varie entre 44 % et 47 %. Bien que le taux final de germination soit supérieur à 92 %, la vitesse de germination des glands frais est très lente, traduisant ainsi l'existence d'une dormance qui semble dépendre de l'arbre producteur. La

conservation permet de lever cette dormance et rend la germination plus rapide et plus groupée. Cependant, la réussite de la conservation est compromise par un ensemble de paramètres dont le plus difficile est la maîtrise de la teneur en eau des glands au cours de la conservation. Pour éviter une germination précoce durant la conservation un léger ressuyage, amenant les glands à une teneur en eau inférieure à 42 %, est nécessaire. Le choix de sacs de conservation est déterminant pour le maintien de cette teneur en eau. L'utilisation de sacs à mailles entraîne une forte perte d'eau des glands qui atteignent très rapidement des valeurs létales de déshydratation. La viabilité des glands au cours de la conservation est non seulement conditionnée par leur déshydratation mais aussi par l'expansion progressive des champignons, présents initialement à l'intérieur du gland qui peut entraîner de grandes pertes. Ces deux facteurs agissent directement sur la perte de l'intégrité membranaire des embryons.

**Remerciements :** Ma profonde gratitude va aux responsables de l'EFN (Estação Florestal Nacional) et particulièrement à Eng<sup>a</sup> Lourdes Santos pour leur aide dans les tests de germination et du CENASEF (Centre National des Semences Forestières-Amarante) pour nous avoir réservé une chambre de conservation. Je tiens aussi à remercier le Professeur De La Plaza pour nous avoir fourni les sacs de conservation de 30 µm. Les Travaux sont financés par le Projet Européen FAIR5-CT97-3480-

## RÉFÉRENCES

- [1] Aissa D., Étude sur la germination des semences de chêne vert (*Quercus ilex* L.) I.- Influence de l'arbre producteur et de la taille des semences, Rev. Cytol. Biol. Végét. Bot. 6 (1983) 5-14.
- [2] Bastien Y., Résultats de semis de glands de conservation en pépinière, Rev. For. Fr. XLIV (1992) 430-433.
- [3] Bonner F.T., Testing for seed quality in Southern oaks. U.S. Dept. Agr. For. Serv., Southern For. Expt. Sta. Res. Note SO-306, 1984.
- [4] Chaussat R., Le Deunff Y., La germination des semences, Gauthier-Villars, Paris, 1975.
- [5] Claudot M., Indications pour la campagne 1974-1975 de récolte, de conservation et de semis de glands des chênes méditerranéens. Mémoire n° 2 du Centre Technique du Génie Rural des Eaux et Forêts France, 1974, pp. 1-32.
- [6] Côme D., Dégazage des enveloppes séminales lors de leur imbibition - I. Cas général, Physiol. Vég. 9 (1971) 439-446.
- [7] Côme D., Dégazage des enveloppes séminales lors de leur imbibition - II. Cas des graines de pommier, Physiol. Vég. 9 (1971) 447-452.

- [8] Delatour C., Morelet M., La pourriture noire des glands, *Rev. For. Fr.* 31 (1979) 101–115.
- [9] Finch-Savage W.E., Embryo water status and survival in the recalcitrant species *Quercus robur* L.: evidence for a critical moisture content, *J. Exp. Bot.* 43 (1992) 663–669.
- [10] Grange R.I., Finch-Savage W.E. Embryo water status during development of the recalcitrant species *Quercus robur*: determination of water relations parameters by pressure-volume analysis, *J. Exp. Bot.* 43 (1992) 657–662.
- [11] Hendry G.A.F., Finch-Savage W.E., Thorpe P.C., Atherton N.M., Buckland S.M., Nilson K.A., Seel W.E., Free radical processes and loss of seed viability during desiccation in the recalcitrant species *Quercus robur* L., *New. Phytol.* 122 (1992) 273–279.
- [12] International Rules for Seed Testing, Determination of moisture content, *Seed Sci. Technol.*, 13 (1985) 338–341.
- [13] Jones L. Recommendations for successful storage of tree seed, *Tree Planters' Notes* 55 (1972) 9–20.
- [14] McKay H.M. Electrolyte leakage from fine roots of conifer seedlings: a rapid index of plant vitality following cold storage, *Can. J. For. Res.* 22 (1992) 1371–1377.
- [15] McKay H.M., Protocol for measuring root electrolyte leakage, Forestry Commission Research Division, U.K, 1996.
- [16] Muller C., Le point sur la conservation des semences forestières et la levée de dormance, *R.F.F.* XXXVIII (1986) 200–204.
- [17] Nyandiga C.O., McPherson G.R. Germination of two warm-temperate oaks, *Quercus emoryi* and *Quercus arizonica*, *Can. J. For. Res.* 22 (1991) 1395–1401.
- [18] Pritchard H.W., Water potential and embryonic axis viability in recalcitrant seeds of *Quercus rubra*, *Ann. Bot.* 67 (1991) 43–49.
- [19] Pritchard H.W., Tompsett P.B., Manger K., Smidt W.J., The effect of moisture content on the low temperature responses of *Araucaria hunsteinii* seed and embryos, *Ann. Bot.* 76 (1995) 79–88.
- [20] Schroeder W.R., Walker D.S., Effects of moisture content and storage temperatures on germination of *Quercus macrocarpa* acorns, *J. Environ. Hort.* 5 (1987) 22–24.
- [21] Vertucci C.W. Relationship between thermal transitions and freezing injury in Pea and Soybean seed, *Plant physiol.* 90 (1989) 1121–1128.
- [22] Vogt A.R., Physiological importance of change in endogenous hormones during red oak stratification, *For. Sci. Bull.* 20 (1974) 187–191.
- [23] Voyiatzis D.G., Pritsa T., The onset and disappearance of relative dormancy of olive embryos as affected by age, *Acta Horticulturae* 356 (1994) 148–151.
- [24] Ysard D., Étude expérimentale de la germination de deux chênes méditerranéens : le chêne pubescent (*Quercus pubescens* Willd.) et le chêne Kermès (*Quercus coccifera* L.), Thèse de 3<sup>e</sup> cycle, Univ. Aix-Marseille, 1987.
- [25] Wang B.S.P., Tree seed storage, *Can. For. Serv. Publ.* 1335 (1974).

# Effects of acorn storage duration and parental tree on emergence and physiological status of Cork oak (*Quercus suber* L.) seedlings

Hachemi Merouani\*, Carmen Branco, Maria Helena Almeida and João S. Pereira

Instituto Superior de Agronomia, Departamento de Engenharia Florestal,  
Tapada da Ajuda, 1399 Lisboa Codex, Portugal

(Received 10 August 2000; accepted 12 January 2001)

**Abstract** – This study was conducted to evaluate how parental trees and seed storage duration influenced subsequent seedling physiological status and growth. Seedling emergence rate was higher than 90% independently of the duration of seed storage or parental trees. Seed storage shortened significantly the time and increased the uniformity of seedling emergence. Consequently, the delayed seedling emergence from fresh seeds could be explained by epicotyl dormancy. Seed size varied with parental tree. Seedling growth rate was greatly affected by seed size, independently of storage treatment. Seedlings originating from large seeds (>5 g) had the fastest growth rates and seedlings from the smallest seeds (<4 g) had the slowest. Final shoot height, however, depended on the duration of seed storage. The seed size and the duration of storage had a great effect on the initial rate of leaf production, but did not affect the final number of leaves. Leaf chlorophyll concentration was reduced as the duration of seed storage increased but was independent of parental tree (i.e., seed size). Seedling biomass was positively related to seed size. The duration of seed storage reduced the shoot/root ratio, but no significant effect was observed among parental trees. The shoot/root value of seedlings from stored seed was about 1.5 and the one of seedlings from fresh seed was about 2.

**seed storage / seed size / seedling growth / shoot / root ratio / *Quercus suber***

**Résumé** – Effet de l'arbre producteur et de la durée de conservation des glands sur l'état physiologique des plants de chêne liège (*Quercus suber* L.). Quel que soit l'âge des glands ou l'arbre producteur, l'émergence des plants est supérieure à 90 %. La durée et l'uniformité de l'émergence des plants sont significativement affectées par la conservation des glands ; par conséquent le retard dans l'émergence des plants issus des glands frais peut être expliqué par l'existence d'une dormance épicotyloire. La croissance des plants est rythmique : elle est caractérisée par une alternance de périodes d'allongement et de périodes de repos. Le rythme de croissance est fortement affecté par la taille des glands quel que soit leur âge. En effet, la croissance des plants issus des gros glands (>5 g) est plus rapide que celles des plants issus des petits glands (<4 g), mais la hauteur finale dépend de l'âge des glands. La taille des glands et leur conservation affectent fortement le rythme d'apparition des feuilles mais pas le nombre final. La concentration en chlorophylle des feuilles diminue chez les plants issus des glands conservés quel que soit l'arbre producteur. La biomasse des différentes parties du plant est réduite pour les petits glands conservés. La conservation des glands influe sur le rapport système aérien/système souterrain, mais aucun effet de l'arbre producteur n'est observé. Sa valeur est de 1,5 pour les plants issus des glands conservés et de 2 pour ceux issus des glands frais.

**conservation des glands / taille des glands / croissance des plants / rapport système aérien/système souterrain / *Quercus suber***

---

\* Correspondence and reprints  
Tel. +351 21 365 33 84; Fax. + 351 21 364 50 00; e-mail: hmerouani@isa.utl.pt

## 1. INTRODUCTION

Cork oak (*Quercus suber* L.) has great social and ecological importance in the Mediterranean region. In many cases, however, natural regeneration is impeded by the biotic and abiotic factors of the forest environment [2, 21, 25, 38] as well as by grazing and management practices of the agro-forestry systems, where they exist. Due to this difficulty, the artificial regeneration may be an important alternative for the rejuvenation of Cork oak stands. In the Mediterranean region seedling establishment from direct sowing of acorns is often poor [18, 34, 40, 45] due to damage caused by rodents, for example. Other techniques were suggested for the regeneration of Cork oak stands. For example, Croizeau and Roget [21] suggested that sowing in spring pre-germinated acorns collected from the ground at the end of winter might be a solution. Nevertheless, the frequency of artificial regeneration by planting is increasing.

In Portugal, a considerable effort has been made during the last 10 years to increase the area of Cork oak stands by planting both in forestland and in abandoned arable land [34]. The rate of success has been quite variable. For example, an evaluation of the afforestation/reforestation with Cork oak by planting in Southern Portugal (Algarve) showed a large seedling mortality (higher than 50% [34]). In experimental plantations carried out to evaluate nursery techniques in southern Portugal, seedling survival varied between 40 and 93% [20, 48] as function of drought, site characteristics, seedling handling [34] and nursery practices [8].

Several studies [7, 8, 26, 31, 32, 36, 41, 44, 47] with other species indicated that the morphological and physiological quality of seedlings is one of the criteria conditioning growth and seedling performance in the field. A positive relationship between seed size and seedling establishment and growth was reported for a variety of species [23, 46], including oaks [14, 15]. A large variability in seed size is common in oak species [3, 39] and could affect seedling quality. On the other hand, it has been shown that seed storage may be a way to palliate the irregular acorn production and to maintain a regular supply of acorns to nurseries [39]. In Cork oak, however, up to now no attempt was done to explore the relationship between parental tree (often associated with seed size) and seedling growth and the effect of seed storage on the physiological status of seedlings. The objectives of this study were to evaluate how parental tree and the duration of acorn storage would influence seedling emergence and subsequent growth and physiological status.

## 2. MATERIALS AND METHODS

At the end of November 1998, morphologically mature acorns were collected from 12 trees at Herdade da Palma (South of Portugal). The details of the site, harvest technique and seed treatment, were described by Merouani et al. [39]. After acorn collection, the seedlots were slightly dried for 1 week at 20 °C and then stored separately in polyethylene bags (30 µm thick) at 0 °C for 6 months. The moisture content of acorns at the beginning of storage ranged between 38% to 45%. Seed size varied between parental trees and the average seed weight are shown in *table 1*.

The seeds with different storage periods, i.e., freshly collected seeds (control) and seeds with 2, 4, and 6-month storage, were sown as described by Merouani et al. [39]. After pre-germination (radicle length of 2–4 cm) the seeds were transferred to plastic containers (37 × 28 × 24 cm) filled with sand and peat (1V/1V) added with 1.5 g L<sup>-1</sup> thiram solution. For each tree, 3 replicates with 4 acorns per replicate were placed in a controlled-environment growth chamber (Fitoclima 700 EDTU, ARALAB, Portugal) with temperature, light, humidity and CO<sub>2</sub> control. Daytime temperature was 25 °C and 18 °C at night. Photoperiod was 10 h light and 14 h dark. The relative humidity was about 65% and 350 ppm CO<sub>2</sub>. Irradiance was on average 900 µmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> at substratum level and 1300 µmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> at maximum plant height. The substratum was watered every second day. The duration of the experiment was 8 weeks.

To evaluate seedling vigour and status, several morphological, physiological and biometric parameters were measured on seedlings from each seed physiological status (fresh and stored). Epicotyl emergence was recorded daily and the sowing date was considered as day 0. For each seedling, shoot height and total number of leaves were monitored weekly. At the end of the growing process and before seedling destruction for biomass analysis, two leaf discs per leaf and one leaf per seedling were removed from the young fully expanded leaves of 4 or 6 seedlings for chlorophyll concentration. Chlorophyll was extracted in the dark from leaf discs ground in a mortar with 80% acetone. The absorbencies were read at 645 and 663 nm respectively in a HITACHI U 2001 spectrophotometer.

The 8-week-old seedlings were harvested for biomass determination. Shoot length, number of leaves, stem diameter and the length of primary roots, were measured. Each seedling was separated into leaves, stem, primary root and lateral (fine) roots, oven dried for 48 h at 80 °C

**Table I.** Effect of parental trees and seed storage duration on the total emergence rate and the emergence precocity of seedlings.

Parental trees	Seed storage duration (months)	% of total emergence	% of emergence at different time interval after seed sowing:			
			15–20 days	20–25 days	25–30 days	> 30 days
1 (6.1 g)	0 (Fresh)	100			50	50
	2	100		50	16.7	33.3
	4	100	41.7	33.3	8.3	16.7
	6	91.7	36.4	63.6		
2 (5.6 g)	0 (Fresh)	83.3		10	70	20
	2	83.3		70	10	20
	4	100	25	25	25	25
	6	100	50	41.7		8.3
3 (3.2 g)	0 (Fresh)	100		16.7	58.3	25
	2	91.7		54.4	9.1	36.4
	4	100	8.3	66.7	25	
	6	100	25	66.7	8.3	
4 (7.0 g)	0 (Fresh)	83.3			80	20
	2	91.7		54.5	27.3	18.2
	4	100	16.7	58.3	16.7	8.3
	6	100	33.3	66.7		
5 (2.7 g)	0 (Fresh)	100		8.3	66.7	25
	2	75		22.2	33.3	44.4
	4	100	8.3	75	8.3	8.3
	6	100	58.3	41.7		
6 (3.7 g)	0 (Fresh)	100		16.7	66.6	16.7
	2	100		50	25	25
	4	83.3		40	60	
	6	75	11.1	77.8	11.1	
7 (6.6 g)	0 (Fresh)	83.3		50	40	10
	2	75		33.3	22.2	44.4
	4	100	50	25	16.7	8.3
	6	100	91.7	8.3		
8 (6.4 g)	0 (Fresh)	83.3		20	40	40
	2	100		41.7	16.6	41.7
	4	91.7	72.7	9.1	18.2	
	6	100	33.3	50	16.7	
9 (7.6 g)	0 (Fresh)	100		25	58.3	16.7
	2	91.7		45.4	36.4	18.2
	4	100	8.3	75	16.7	
	6	100	16.7	75	8.3	
10 (5.3 g)	0 (Fresh)	100			16.7	83.3
	2	100		91.7	8.3	
	4	91.7		27.3	63.6	9.1
	6	100	16.7	66.7	8.3	8.3
11 (4.5 g)	0 (Fresh)	100			83.3	16.7
	2	83.3		60	10	30
	4	66.6		62.5	25	12.5
	6	100	16.7	75	8.3	
12 (5.8 g)	0 (Fresh)	100			58.3	41.7
	2	91.7		18.2	72.7	9.1
	4	100	16.7	58.3	16.7	8.3
	6	100	25	66.7	8.3	

The value between parentheses (column 1) corresponds to the seed fresh weight.

and the dry weight of each plant part was then determined. Shoot/root ratio and root/total seedling biomass, were calculated.

A two-way analysis of variance (ANOVA) was performed to determine the effects of seed size and the duration of cold storage on the different parameters evaluated. To compare time of emergence, total stem and primary root length, total number of leaves, basal diameter, chlorophyll concentration and biomass of seedlings from the 2, 4 and 6 months stored seed with those of seedling from fresh seed, the Dunnett's test versus control was used. The Tukey's multiple comparison procedure was used to distinguish effects of parental trees.

### 3. RESULTS

#### 3.1. Seedlings emergence

The rate and time of emergence of seedlings from fresh and stored seeds of the 12 parental trees are shown in *tables I and II*. Total seedling emergence was higher than 90% for all parental trees and seed physiological status (fresh or stored), except in the cases where some seedlings died just after emerging (*table I*). For all paren-

tal trees seedling emergence from fresh seed was higher than 25 days, whereas in the 4 and 6 months stored seed a high emergence rate was already observed between 15 and 20 days after sowing (*table I*). The time of epicotyl emergence was significantly reduced in stored seeds in comparison to the fresh seeds (*table II*). Although no correlation was observed between seed weight and the seedling emergence time ( $r^2 = 0.008, 0.006, 0.009$  and  $0.02$  respectively for fresh seed and for 2, 4 and 6 months stored seed), it appears that seedling emergence varied between parental trees (*table II*). The later emergence of the seedlings from the fresh seed of tree No. 10 was significantly different ( $P < 0.05$ ) from that of trees No. 7, 9, 3 and 6 (*table II*). Most of the seedlings (83.3%) from fresh seed of tree No. 10 emerged only after 35 days after sowing, whereas half of the seedlings of tree No. 7 emerged at 20–25 days (*table I*). However, this variability in emergence disappeared when the seeds were stored. The differences between trees after 2 ( $P = 0.190$ ) and 4 months storage ( $P = 0.298$ ) were not significant (*table II*).

#### 3.2. Seedling growth and number of leaves

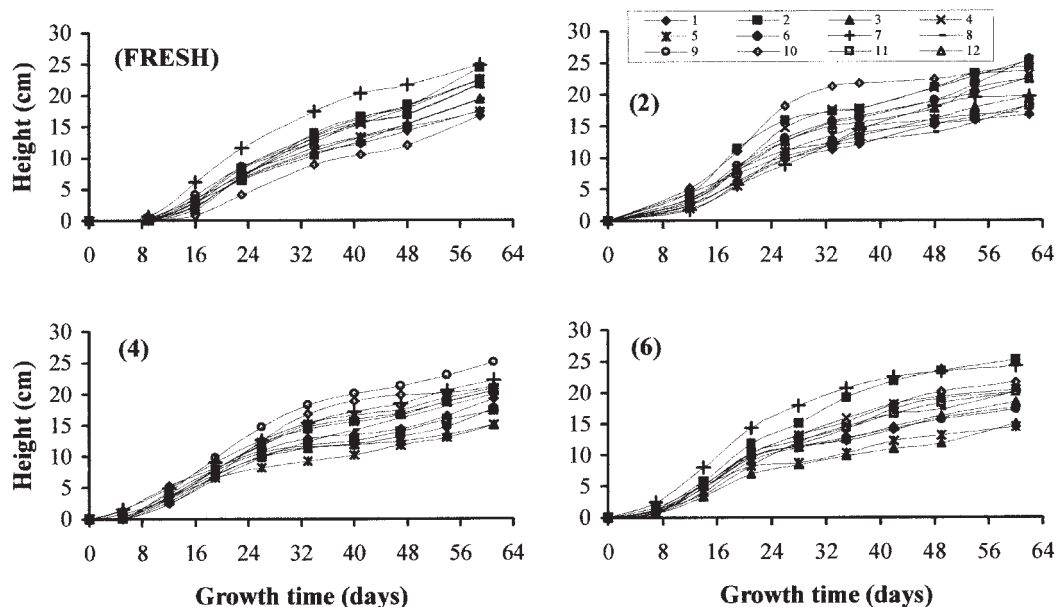
*Figure 1* illustrates the growth rhythm of the 8-week-old seedlings. Four growth phases were distinguished

**Table II.** Effect of parental trees and seed storage duration on seedling emergence time (days).

Parental trees	Seed storage duration (months)			
	0 (fresh)	2	4	6
1	31.2ab (8.0)	32.2a (10.9)	25.7a* (11.7)	22.2ab* (2.4)
2	28.0ab (2.7)	27.5a (7.5)	26.9a (7.7)	22.0ab* (3.9)
3	27.3a (2.9)	31.5a (14.2)	24.2a* (2.9)	23.3ab* (2.7)
4	29.3ab (6.6)	30.9a (12.6)	24.7a* (5.1)	22.0ab* (2.6)
5	28.3ab (3.1)	30.7a (5.9)	25.7a (7.4)	20.6ab* (3.1)
6	27.4a (3.1)	31.1a (11.8)	26.3a (2.5)	21.6ab* (2.2)
7	26.2a (4.0)	33.9a (9.4)	24.7a (10.1)	18.6a* (2.2)
8	28.2ab (3.2)	34.6a (15.5)	30.8a (13.9)	22.9ab* (4.0)
9	27.5a (4.4)	30.0a (10.4)	24.4a (1.9)	23.3ab* (2.6)
10	35.8b (7.0)	24.6a* (2.0)	29.2a* (7.7)	23.8b* (3.2)
11	28.3ab (3.7)	32.5a (14.9)	24.7a (3.7)	23.2ab* (1.9)
12	29.5ab (3.6)	28.4a (2.7)	24.5a* (4.2)	23.0ab* (2.1)

The value between parentheses represents the standard deviation.

\* Significant differences in seedlings emergence from stored seed with the one from fresh seed. In the same column values sharing the same letter are not significantly different.



**Figure 1.** Growth rhythm of seedlings from pre-germinated fresh seed and stored seed for 2, 4 and 6 months. Each curve refers to the parental tree (1 to 12).

during the time of the experiment: the first, corresponding to seedling emergence (5–10 days after the start of the experiment), the second was characterised by the relative fast growing, lasting about 2 weeks. A third phase of slow growth was followed by the last phase of rapid growth, well defined for seedlings from fresh seed (*figure 1*). The growth rhythm and the duration of the third phase appear to be dependent on seed storage duration and parental tree. The increase in the number of leaves showed the same patterns described above (data not shown).

*Figure 1* shows that growth in height was greatly affected by parental tree. Seedlings from seeds of trees No. 5 and 3 (small seeds) had the slowest growth rates and the ones from seeds of tree No. 7, 4, 9 and 2 (large seeds) had the highest growth rates (*figure 1*). However, seedlings from fresh seeds of tree No. 10 showed the slowest growth rate. The increment in leaf number followed the same pattern (data not shown). Therefore, the effect of parental tree on the final shoot height appears to be dependent on the seed physiological status (fresh or stored). Even though there were small differences between parental trees in the case of fresh seeds, the variability in height among parental trees increased with the duration of seed storage (*table III*). The final shoot height of seedlings originating from seeds of trees No. 5, No. 3 and No. 6 (small acorns) was significantly lower than in

seedlings issued from large acorns. In the case of fresh seed, there were differences only between trees No. 10 and No. 7 (*table III*). On the other hand, even though the seeds from trees No. 1 and No. 12 were large, they produced the shortest seedlings after 6 months of storage. For the final number of leaves, however, no significant differences were observed among parental trees as a consequence of a large variability within the population of seedlings originating from the each individual. This variation was less pronounced in seedlings from fresh seeds than from those issued from seeds stored for 6 months (*table III*).

### 3.3. Chlorophyll Concentration

The leaf chlorophyll concentration of seedlings from fresh and stored seed showed a non-significant variation between parental trees ( $P = 0.128$ ), but for most parental trees it decreased significantly with the duration of seed storage especially after 4 and 6 months storage (*figure 2*).

### 3.4. Primary root length and stem diameter

*Figure 3* shows an increase in primary root length with seed storage duration. After 6 months of storage this increase in primary root length became significant for

**Table III.** Effect of parental trees and seed storage duration on the final shoot height (cm) and the final number (No.) leaves of 8-week-old seedlings.

Parental trees	Seed storage duration (months)							
	0 (Fresh)		2		4		6	
	Height	No. Leaves	Height	No. Leaves	Height	No. Leaves	Height	No. Leaves
1	17.5ab (5.7)	22.8a (11.1)	15.2ab (5.0)	16.7a (5.2)	19.3ab (8.6)	22.7a (15.9)	17.6 (3.9)	17.5ab (3.4)
2	24.4ab (9.0)	28.7a (12.5)	17.7ab (6.9)	24.4a (9.9)	20.6ab (11.7)	27.0a (16.4)	25.3 (5.2)	22.1ab (4.6)
3	19.4ab (5.7)	22.3a (3.9)	16.0ab (5.5)	19.6a (6.6)	15.1a (5.1)	19.2a (5.1)	15.0 (3.4)	17.8ab (5.3)
4	24.5ab (7.8)	34.9a (20.7)	17.2ab (7.3)	25.4a (10.9)	21.0ab (6.4)	29.3a (10.5)	20.5 (4.7)	24.7a (10.5)
5	17.3ab (5.5)	21.1a (11.0)	10.6*a (5.8)	17.2a (7.5)	15.1a (2.8)	17.3a (3.9)	14.5 (3.6)	16.6b (2.7)
6	21.7ab (7.3)	25.4a (9.2)	18.3ab (5.9)	25.5a (13.8)	17.7ab (6.1)	20.2a (5.8)	17.3 (3.4)	19.9ab (3.0)
7	26.9a (6.9)	30.6a (16.8)	17.4*ab (4.1)	19.7a (4.1)	22.2ab (8.5)	23.6a (10.5)	24.2 (4.3)	22.0ab (6.4)
8	19.9ab (8.2)	22.5a (6.2)	16.4ab (7.1)	18.3a (5.2)	20.0ab (7.4)	23.6a (10.2)	20.1 (5.1)	22.2ab (7.6)
9	22.5ab (8.5)	25.8a (14.2)	21.1b (7.3)	22.6a (8.2)	25.0b (7.3)	29.2a (9.4)	20.0 (4.7)	19.5ab (4.1)
10	16.7b (7.9)	21.8a (13.9)	21.2b (5.7)	23.7a (11.1)	21.2ab (8.0)	28.8a (12.7)	21.6 (6.0)	21.3ab (6.2)
11	22.4ab (6.4)	31.9a (11.6)	17.0ab (6.6)	18.8*a (6.2)	17.3ab (4.4)	20.0*a (5.2)	20.0 (4.8)	21.3*ab (3.4)
12	21.8ab (7.7)	31.9a (17.3)	18.4ab (4.7)	24.6a (8.7)	20.5ab (4.9)	27.9a (9.9)	18.5 (3.3)	20.7ab (6.4)
Significant differences in final shoot height among parental trees						→	2 # 5, 3, 6, 1, 12; 10 # 5, 3;	7 # 5, 3, 6, 1 9 # 5

The value between parentheses represents the standard deviation.

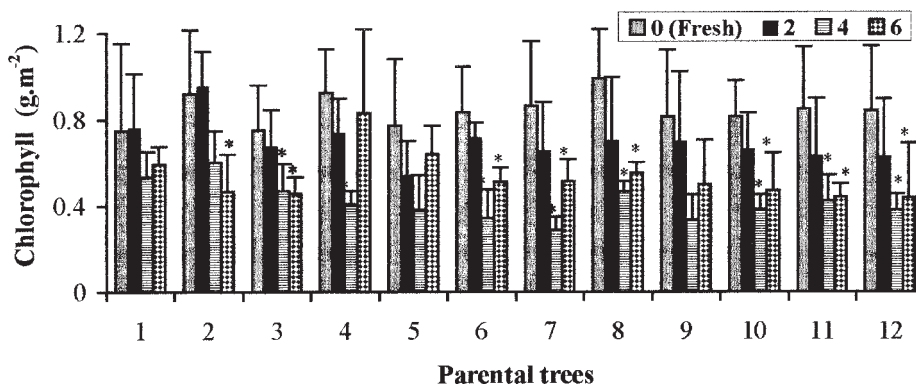
\* Significant differences in final shoot height or number of leaves of seedlings from stored seed with the ones from fresh seed. In the same column values sharing the same letter are not significantly different.

**Table IV.** Effect of parental trees and seed storage duration on shoot/root ratio of 8-week-old seedling.

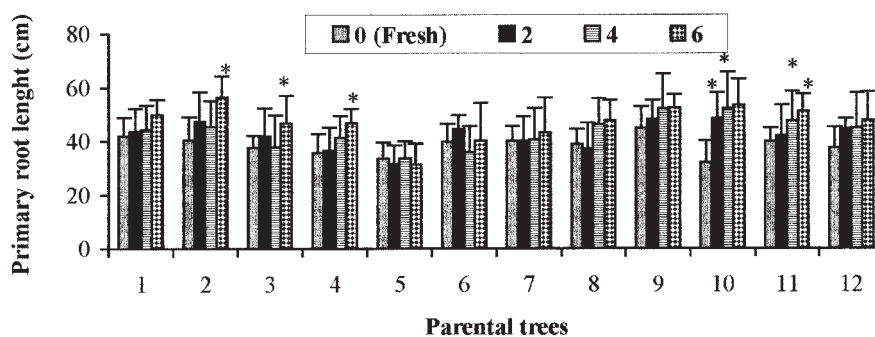
Parental trees	Storage duration (months)							
	0 (Fresh)		2	4	6			
1	1.42b	(0.19)	1.02a*	(0.26)	1.66a	(0.46)	1.09a	(0.22)
2	1.88bcd	(0.28)	1.48a	(0.32)	1.63a	(0.60)	1.13a*	(0.17)
3	2.38bcd	(0.63)	1.43a*	(0.74)	1.86a	(0.52)	1.47a*	(0.46)
4	1.65bcd	(0.59)	1.45a	(0.36)	1.94a	(0.57)	1.41a	(0.26)
5	2.28acd	(1.09)	1.37a	(0.60)	1.76a	(0.47)	1.60a	(0.39)
6	1.48bcd	(0.35)	1.14a	(0.41)	1.71a	(0.55)	1.43a	(0.36)
7	1.94bcd	(0.16)	1.19a	(0.31)	1.40a	(0.58)	1.18a*	(0.35)
8	2.55abcd	(0.52)	1.34a*	(0.65)	2.06a	(0.89)	1.62a*	(0.42)
9	2.60a	(1.05)	1.31a*	(0.27)	1.64a*	(0.57)	1.08a*	(0.31)
10	2.13bcd	(1.01)	1.20a	(0.20)	1.69a	(0.45)	1.76a	(0.47)
11	2.16acd	(0.28)	1.14a*	(0.58)	1.79a	(0.60)	1.59a*	(0.25)
12	1.82bcd	(0.85)	1.44a	(0.33)	1.60a	(0.38)	1.41a	(0.27)

The value between parentheses represents the standard deviation.

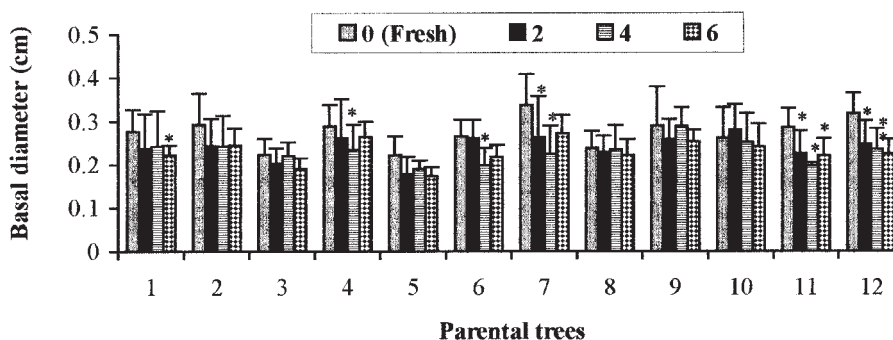
\* Significant differences in shoot/root ratio of seedling from stored seed with the one from fresh seed. In the same column values sharing the same letter are not significantly different.



**Figure 2.** Effect of parental trees and seed storage duration on chlorophyll concentration of 8-week-old seedlings.  
\* Significant differences in leaf chlorophyll concentration of seedlings from stored seed with the one from fresh seed.



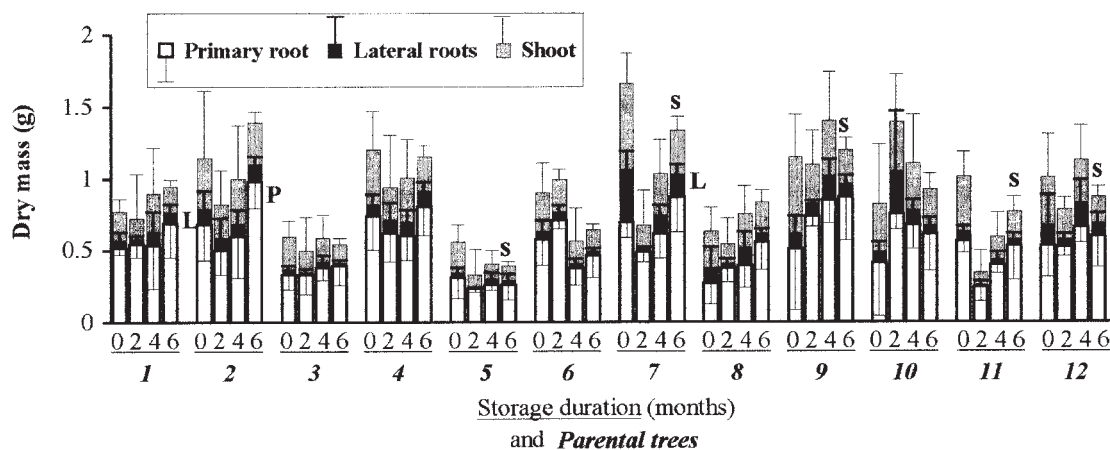
**Figure 3.** Effect of parental trees and seed storage duration on the primary root length of 8-week-old seedlings.  
\* Significant differences in primary root length of seedlings from stored seed with the one from fresh seed.



**Figure 4.** Effect of parental trees and seed storage duration on basal diameter of 8-week-old seedlings.  
\* Significant differences in basal diameter of seedlings from stored seed with the one from fresh seed.

many parental trees. Seedlings from seeds stored for 6 months of tree No. 5 and No. 6 (small seeds) had the shortest primary root and those from seeds of trees No. 2, No. 10 and No. 9 the longest (figure 3). The variation among parental trees became more important as storage duration increased.

Although, the duration of seed storage led to a decrease in seedling stem diameter for all parental trees but became significant only for trees No. 1, No. 11 and No. 12 at 6 months storage (figure 4). In general, the seedlings from the smallest seed (trees No. 5 and No. 3) had significantly lower stem diameter independently of storage time (figure 4).



**Figure 5.** Effect of parental trees and seed storage duration on primary root and lateral roots and shoot biomass of 8-week-old seedlings. S, P and L represents the significant differences in shoot, primary root and laterals roots, respectively of seedlings from seeds stored for 6 months to those from fresh seeds.

**Table V.** Effect of parental trees and seed storage duration on Root/Total biomass ratio of 8-week-old seedling.

Parental trees	Storage duration (months)			
	0 (Fresh)	2	4	6
1	0.42a (0.04)	0.50a* (0.06)	0.38a (0.06)	0.48a* (0.05)
2	0.35ab (0.04)	0.41a (0.05)	0.40a (0.11)	0.47a* (0.04)
3	0.31ab (0.07)	0.46a (0.20)	0.36a (0.07)	0.42a (0.08)
4	0.40ab (0.11)	0.42a (0.06)	0.36a (0.10)	0.42a (0.04)
5	0.33ab (0.11)	0.44a (0.10)	0.37a (0.06)	0.39a (0.06)
6	0.41ab (0.05)	0.49a (0.13)	0.39a (0.09)	0.42a (0.06)
7	0.34ab (0.02)	0.46a (0.06)	0.44a (0.12)	0.47a (0.07)
8	0.29b (0.04)	0.47a (0.18)	0.36a (0.12)	0.39a (0.07)
9	0.30ab (0.10)	0.44a* (0.05)	0.39a* (0.08)	0.49a* (0.06)
10	0.35ab (0.12)	0.46a* (0.04)	0.38a (0.06)	0.37a (0.06)
11	0.32ab (0.03)	0.50a* (0.17)	0.37a (0.07)	0.39a (0.04)
12	0.38ab (0.10)	0.42a (0.05)	0.39a (0.06)	0.42a (0.05)

The value between parentheses represents the standard deviation.

\* Significant differences in root/total biomass ratio of seedling from stored seed with the one from fresh seed. In the same column values sharing the same letter are not significantly different.

### 3.5. Seedling biomass

For many parental trees the seedling stem biomass decreased significantly with the duration of seed storage. On the contrary, little change was observed for the below-ground biomass (primary root and lateral roots) (figure 5). For the primary root biomass the differences

among parental trees became more important as storage duration increased, and no differences were found for stem and lateral roots biomass. In seedlings issued from seeds stored for 6 months, the primary root biomass decreased significantly for trees No. 5, No. 3, No. 6 and No. 11 (small seed) and for trees No. 10 and No. 12 (large seed).

The seedlings from fresh seed of most parental trees showed higher values of the shoot/root ratio (about 2), but those originating from stored seeds, the ratio was 1.5 in average, over all seed storage periods (*table IV*). Moreover, the seedling shoot/root ratio decreased as seed storage duration increased and became significant after 6 months storage for at least half of parental trees (*table IV*). The differences in shoot/root ratio among parental trees occurred only in seedlings from fresh seeds (*table IV*). Concomitantly, the root/total seedling biomass increased with seed storage but no significant differences were found between parental trees except the differences between trees No. 1 and No. 8 for the fresh seeds (*table V*).

#### 4. DISCUSSION

The success of afforestation/reforestation programmes often depends upon availability and viability of seeds and seedling quality. The latter may be defined as the integration of morphological and physiological characteristics, which control the possibilities of survival and growth [8, 30]. According to Mattsson [35] however, there are still no seedling attributes predicting field performance. On the other hand, the rate and the uniformity of seedling emergence are important issues in nursery practice. In our study we found that seedling emergence rate and parameters such as shoot/root ratio, often related with growth and survival after planting, were influenced seed storage duration and parental trees in Cork oak. In this study, acorn size varied mostly with parental trees. This variation among trees of the same population is common in *Quercus* species [3, 15]. Acorn size may influence growth and survival of seedlings. Brookes and Wigston [15] showed that large acorns of *Q. petraea* and *Q. robur* have greater amounts of nutrients. Studies, on *Quercus rugosa* and *Q. laurina* showed that seedling size was significantly affected by the amount of reserves originally available in the cotyledons [14]. Therefore, the decrease in final shoot height and in stem diameter of seedlings from smallest seeds and from large seeds (trees No. 1 and No. 12) at 6 months of seed storage, could be explained by the initial amount reserves in one case, and their depletion during storage in the other case. It is known that soluble carbohydrates generally decline with seed ageing [42].

Although the percentage of seedling emergence was very high (more than 90%) and independent of seed storage duration and parental trees, the non-emergence and

the precocious mortality of some seedlings (see *table I*) was probably due to the deficiency of reserves in the acorns (cotyledons). Bonfil [14] concluded that a low amount of reserves after excision of cotyledons affect greatly the seedling survival.

The duration of seed storage affected significantly seedling emergence time and uniformity. The delay in the emergence of seedlings from fresh seeds as compared to stored seeds can be explained by the existence of epicotyl dormancy, which progressively breakdown as seed storage duration increased. This epicotyl dormancy may be related to high seed moisture content, as observed for fresh seed of tree No. 10, which was very high (about 52.84%) [39].

Cork oak seedlings grow rhythmically: after emergence the shoot elongation occurs by rapid growing lasting about 2 weeks, which alternate with resting periods. This characteristic is already known for almost all Temperate Zone species [33, 43] including oak species [4, 9, 10] in the juvenile phase.

The seedling growth rate was greatly affected by seed size, both just at harvest time (fresh seed) and after seed storage. Seedlings from large seeds (>5 g) had the highest and seedlings from smallest seeds (<4 g) the lowest growth rates. Bonfil [14] showed the same effect of acorn size on the seedling growth. However, the consequences of growth rate on final shoot height depended on duration of seed storage (see *figure 1*). In fact, the final shoot height of seedlings issued from the smallest seeds was only significantly reduced for stored seeds, even though the growth rate of seedlings from fresh seed was low. The relatively longer resting period of the seedlings from stored seed may be responsible for the reduction of their final shoot height. For many authors, growth inhibition is related to the metabolism regulation and to the mechanisms of transport of nutrient [5, 11, 12, 43]. In *Castanea sativa*, the diffusion of the acid 5,5'-dimethylxazolidin 2,4-dione (DMO) and its accumulation in the meristematic zone of the apical bud favoured shoot elongation [43]. Excision of the young leaves, causing a continuous growth of pedunculate oak seedlings, showed that apical bud accumulates always-high <sup>14</sup>C-DMO than the internode [9]. For the same species, the resting period is characterised by energetic deficiency resulting from a weak capacity to synthesis adenylic and non-adenylic nucleotide [5]. The seed size and their storability had a great effect on the number of leaves and was well correlated with growth, but did not affect the final number of leaves because of the large variation between seedlings.

Leaf chlorophyll concentration may be related to leaf photosynthetic activity in plants grown in the same light environment. It was reduced as seed storage time increased and was indifferent with seed size. This fact reinforces the idea that seedling size (final shoot height and stem diameter) depends more strongly on the initial cotyledonary reserves than on the photosynthates produced after germination. Bonfil [14] studying the effect of cotyledon removal showed that the reserves remaining in the seed 1 month after germination still contributed to seedling survival. The decrease in biomass of different seedling parts from the stored smallest seeds, which contain probably few reserves, also supports this idea. Seed size also affected root biomass of *Quercus rugosa* at the age of 5 months [14].

The shoot/root ratio is another important variable that can be used to predict seedling performance in the field. It becomes even more important on dry sites where soil moisture is critical for survival [22]. It is known that soil drought is the first cause of seedling mortality just after planting [13, 28]. The seed storage affected the values of shoot/root by reducing them and no significant differences were observed between parental trees. In fact, the shoot/root value of seedlings from stored seed was about 1.5 and that from seedlings from fresh seed was about 2. The equilibrium in the biomass of seedling components could play an important role at planting time, as it reduces the water loss by evapotranspiration and increases water uptake. For Douglas fir, a good shoot/root ratio would be 1.5, whereas a poor shoot/root ratio can be as much as 3 [22].

The increase in size of the root systems of seedlings issued from stored seed was directly related to the increase of taproot biomass and, probably, to the carbohydrate reserves accumulated there. For many species, e.g. *Quercus rubra* the allocation of carbohydrate reserves could vary as a function of the phenology of shoot growth, and the species with the most determinate shoot growth patterns had the highest total mass of carbohydrate reserves [17]. If this is true, our seedlings from large seeds could accumulate more carbohydrate reserves because of their rapid growth. It has been showed [1, 19, 24, 27] that the carbohydrate reserves play an important role in lateral root emergence, and that seedling performance depends on the rapidity of emergence of lateral roots [6, 16, 37].

We conclude that producing seedlings from stored seed could have a double strategical interest in the nursery. It would enable to counter the irregular acorn production and to supply, at any time, acorns able to

germinate. It would also give the opportunity to choose the seedling age and the best time to plant. The reduction in the time of emergence, the improvement of emergence uniformity and increase of root system size as a result of seed storage, are the best objectives requested by the nursery.

**Acknowledgements:** We thank the Estação Florestal Nacional (EFN), which made its seed laboratory available for germination tests and the CENASEF staff for their storage room chamber availability. This work was financed by an EC project, contract FAIR5-CT97-3480.

## REFERENCES

- [1] Aarrouf J., Darbelley N., Demandre C., Razafindramboana N., Perbal G., Effect of horizontal clinorotation on the root system development and on lipid breakdown in Rapeseed (*Brassica napus*) seedlings, *Plant Cell Physiol.* 40 (4) (1999) 396–405.
- [2] Actes du séminaire méditerranéen sur la régénération des forêts de chêne liège, Tabarka, 22–24 octobre 1996, *Annales de l'INRGREF*, No. spécial, 1998, 253 p.
- [3] Aissa D., Étude sur la germination des semences de chêne vert (*Quercus ilex* L.) I : Influence de l'arbre producteur et de la taille des semences, *Rev. Cytol. Bio. Végét. Bot.* 6 (1983), 5–14.
- [4] Alatou D., Barnola P., Lavarenne S., Gendraud M., Caractérisation de la croissance rythmique du chêne pédonculé, *Plant. Physiol. Biochem.* 27 (2) (1989) 275–280.
- [5] Alatou D., Recherches sur le déterminisme de la croissance rythmique du chêne : *Quercus pedunculata* Ehrh- *Quercus mirbeckii* Durieu- *Quercus suber* L. – Étude morphologique, biochimique et écophysiological, Thèse de Doctorat d'État en Sciences Naturelles, Université de Constantine (Algérie) et Blaise Pascal Clermont II (France), 1990, 109 p. et annexe.
- [6] Aussenac G., El Nour M., Évolution du potentiel hydrique et du système racinaire de jeunes plants de cèdre, pin laricio de Corse et pin noir plantés à l'automne et au printemps, *Ann. Sci. For.* 43 (1986) 1–14.
- [7] Aussenac G., El Nour M., Reprise des plants et stress hydriques, *Rev. For. Fr.* XXXVIII (3) (1986) 264–270.
- [8] Aussenac G., Guehl J.M., Kaushal P., Granier A., Grieu Ph., Critères physiologiques pour l'évaluation de la qualité des plants forestiers avant plantation, *Rev. For. Fr.* XL (No. spécial) (1988) 131–139.
- [9] Barnola P., Alatou D., Lacoïnte A., Lavarenne S., Étude biologique de la croissance rythmique du chêne pédonculé (*Quercus robur* L.). Effet de l'ablation des feuilles, *Ann. Sci. For.* 21 (1990) 619–631.

- [10] Barnola P., Alatou D., Parmentier C., Vallon C., Approche du déterminisme du rythme de croissance endogène des jeunes chênes pédonculés par modulation de l'intensité lumineuse, *Ann. Sci. For.* 50 (1993) 257–272.
- [11] Barnola P., Crochet A., Payan E., Gendraud M., Lavarenne S., Modification du métabolisme énergétique et de la perméabilité dans le bourgeon apical et l'axe sous-jacent cours de l'arrêt de croissance momentané de jeunes plants de chêne, *Physiol. Vég.* 24 (3) (1986) 307–314.
- [12] Barnola P., Lavarenne S., Gendraud M., Dormance des bourgeons apicaux de frêne (*Fraxinus excelsior* L.) : évaluation du pool des nucléosides triphosphates et éventail des températures actives sur le débourrement des bourgeons en période de dormance, *Ann. Sci. For.* 43 (3) (1986) 339–350.
- [13] Blake T.J., Sutton R.F., Variation in water relations of black spruce stock types planted in Ontario, *Tree Physiol.* 3 (1987) 331–343.
- [14] Bonfil C., The effects of seed size, cotyledon reserves, and herbivory on seedling survival and growth in *Quercus rugosa* and *Q. laurina* (Fagaceae), *Am. J. Bot.* 85 (1) (1998) 79–87.
- [15] Brookes P.C., Wigston D.L., Variation of morphological and chemical characteristics of acorns from populations of *Quercus petraea* (Matt.) Liebl., *Q. robur* L. and their hybrids, *Watsonia* 12 (1979) 315–324.
- [16] Burdett A.N., Physiological processes in plantation establishment and the development of specification for forest planting stock, *Can. J. For. Res.* 20 (1990) 415–427.
- [17] Canham C.D., Kobe R.K., Latty E.F., Chazdon R.L., Interspecific and intraspecific variation in tree seedling survival: effects of allocation to roots versus carbohydrate reserves, *Oecologia* 121 (1) (1999) 1–11.
- [18] Carvalho J.B., Morais C.J.E., Análise da florestação em Portugal 1966-1995, Reunião de Especialistas em Reabilitação de Ecossistemas Florestais Degradados, Instituto Florestal, Lisboa, 1996, Portugal.
- [19] Chenevard D., Frossard J.S., Lacoite A., Lipid utilization and carbohydrate partitioning during germination of English walnut (*Juglans regia*), *Ann. Sci. For.* 51 (1994) 373–379.
- [20] Costa-e-Silva F., L. Carla., Fabião A., Almeida M.H., Produção de sobreiros em viveiro : Qualidade e Certificação, in *Recopilación de trabajos, Congreso sobre Forestación en las dehesas, Mérida, 20–22 mayo 1999.*
- [21] Croizeau D., Roguet M., Faculté de reprise de glands prélevés en forêt après germination, *Rev. For. Fr.* XXVIII (4) (1976) 275–279.
- [22] Duddles R.E., Landgren C.G., Selecting and buying quality seedlings, *The woodland workbook, reforestation, Oregon State University, 1993, 1–11.*
- [23] Eriksson O., Seed size variation and its effect on germination and seedling performance in the clonal herb *Convallaria majalis*, *Acta Oecologica* 20 (1) (1999) 61–66.
- [24] Ernst M., Chatterton N.J., Harrison P.A., Carbohydrate changes in chicory (*Cichorium intybus* L. var. *foliosum*) during growth and storage, *Scientia Horticulturae* 63 (1995) 251–261.
- [25] Frochot H., Picard J.F., Dreyfus Ph., La végétation herbacée obstacle aux plantations, *Rev. For. Fr.* XXXVIII (3) (1986) 271–278.
- [26] Girard S., Clément C., Boulet-Gercourt B., Guehl J.M., Effects of exposure to air on planting stress in red oak seedlings, *Ann. Sci. For.* 54 (1997) 395–401.
- [27] Girard S., Déterminants écophysiologicals de la crise de transplantation de plants d'espèces forestières résineuses (*Pinus nigra* ssp. *laricio* Poir. var. *Corsicana*) et feuillue (*Quercus rubra* L.). Effet du stockage des plants, Thèse de Magister, Institut de Doctorat en Biologie Forestière, Université Henri Poincaré-Nancy I, 1996, 84 p.
- [28] Hansson A.C., Zhao A.F., Andrén O., Fine-root growth dynamics of two shrubs in semiarid rangeland in Inner Mongolia, China, *Ambio* 23 (1994) 225–228.
- [29] Hopper N.W., Overholt J.R., Martin J.R., Effect of cultivar, temperature and seed size on the germination and emergence of soya beans (*Glycine max* (L.) Merr.), *Ann. Bot.* 44 (1979) 301–308.
- [30] Johson J.D., Cline M.L., Seedling quality of southern Pine, in: Duryea M.L., Dougherty P.M. (Eds.), *Forest regeneration manuel, Kluwer Academic Press, Netherlands, 1991, pp. 143–159.*
- [31] Kolb P.F., Robberecht R., High temperature and drought stress effects on survival of *Pinus ponderosa* seedlings, *Tree Physiol.* 16 (1996) 665–672.
- [32] Kormanik P.P., Can oak seedling quality be quantified by lateral root number?, in: *Third workshop on seedling physiology and growth problems in Oak plantings, Carbondale, Illinois, 12–13 February 1986 (Abstract), US, p. 19.*
- [33] Lavarenne S., Champagnat P., Barnola P., Croissance rythmique de quelques végétaux ligneux des régions tempérées cultivés en chambres climatisées à température élevée et constante et sous diverses photopériodes, *Bull. Soc. Bot. Fr.* 118 (1971) 131–162.
- [34] Louro G., Avaliação da aplicação de programas de apoio à floresta na região do algarve, *Direcção Geral das Florestas (DGF-Lisboa), Portugal, 1999.*
- [35] Mattsson A., Predicting field performance using seedling quality assessment, *New For.* 13 (1997) 227–252.
- [36] McKay H.M., Jinks R.L., McEvoy C., The effect of desiccation and rough-handling on the survival and early growth of ash, beech, birch and oak seedling, *Ann. For. Sci.* 56 (1999) 391–402.
- [37] McKay H.M., Root Electrolyte Leakage and Root Growth Potential as Indicators of Spruce and Larch Establishment, *Sylva Fennica* 32 (3) (1998) 241–252.
- [38] Merouani H., Acherar M., Istanbuli A., Recherche de quelques contraintes biotiques et abiotiques à la régénération naturelle du chêne liège *Quercus suber* L., Séminaire Méditerranéen sur la Régénération des Forêts de Chêne Liège. Tabarka, 22–24 octobre 1996, *Annales de l'INRGREF (No. spécial)* (1998) 225–243.
- [39] Merouani H., Branco C., Almeida M.H., Pereira J.S., Comportement physiologique des glands de chêne liège

(*Quercus suber* L.) durant leur conservation et variabilité inter-individus producteurs, Ann. For. Sci. 58 (2001) 143–153.

[40] Messaoudène M., Résultats des essais de semis directs du chêne liège à Melata, Rapport interne, Institut National de Recherche Forestière (INRF-Algérie), 1984, 10 p.

[41] O'Reilly C., McCarthy N., Keane M., Harper C.P., Gardiner J.J., The physiological status of Douglas fir seedlings and the field performance of freshly lifted and cold stored stock, Ann. For. Sci. 56 (1999) 391–402.

[42] Petruzelli L., Taranto G., Wheat aging: the contribution of embryonic and non-embryonic lesions to loss seed viability, Physiol. Plant 76 (1989) 289–294.

[43] Pezet Y., Si-Mohamed C., Croissance, morphogenèse et dynamique de l'état physiologique des bourgeons de jeunes plants de Châtaignier (*Castanea sativa* Miller) en conditions naturelles et contrôlées, Ann. Sci. For. 45 (1) (1988) 17–32.

[44] Riedacker A., Production et plantation de plants à racines nues ou en conteneurs, Rev. For. Fr. XXXVIII (3) (1986) 226–236.

[45] Sondergaard P., Essais de semis du chêne liège *Quercus suber* L. dans la forêt de Bab-Azhar, une subéraie de montagne au Maroc, Ann. Rech. Forest. Maroc 25 (1991) 16–29.

[46] Susko D.J., Lovett-Doust L., Patterns of seed mass variation and their effects on seedling traits in *Alliaria petiolata* (Brassicaceae), Am. J. Bot. 87 (2000) 56–66.

[47] Tinus R.W., Root growth potential as an indicator of drought stress history, Tree Physiol. 16 (1996) 795–799.

[48] Vale R., Chambel RM., Matos A., Moura S., Pereira C., Almeida MH., Técnicas de produção de plantas de sobreiro em viveiro : efeito do contentor e do substrato, in Recopilación de trabajos, Congreso sobre Forestación en las dehesas, Mérida, 20–22 mayo 1999.

## Morphological and physiological maturation of acorns of cork oak (*Quercus suber* L.)

H. MEROUANI, L.M. APOLINÁRIO, M.-H. ALMEIDA AND J.S. PEREIRA

Instituto Superior de Agronomia, Departamento de Engenharia Florestal, Tapada da Ajuda, 1399 Lisboa Codex, Portugal (E-mail: hmerouani@isa.utl.pt)

(Accepted February 2002)

### Summary

In order to improve the long-term storage of cork oak (*Quercus suber* L.) acorns, it is important to define the period of maturity. Changes in the morphological, physiological and biochemical characteristics were examined during acorn development until shedding. The complete acorn maturation was attained between November 8 and November 22. The reduction in moisture content differed greatly between acorn tissues with the pericarp and the embryo losing less water than cotyledons during the maturation process. Acorns were shed at high moisture content, the level could vary slightly among parental trees due to the variability in pericarp moisture content. At time of acorn shedding the cotyledon moisture content was about 46% (% fresh weight), the embryonic axis 63% and the pericarp ranged between 59 and 65%. The moisture content of cotyledons was found to be a good index of morphological maturity. Physiological maturity was more precocious than morphological maturity. The acorns acquired the ability to germinate early during maturation and reached their maximum capacity when the acorn moisture content decreased from 72% to 67% and the embryonic soluble sugars reached a steady state of about 238 mg.g<sup>-1</sup> dry weight.

### Introduction

Cork oak (*Quercus suber* L.) has great social and ecological importance in the western Mediterranean region. In many cases, however, natural regeneration is impeded by the biotic and abiotic factors of the forest environment (Croizeau and Roguet, 1976; Frochot *et al.*, 1986; Anonymous, 1998; Merouani *et al.*, 1998) as well as by grazing and management practices of agro-forestry systems, where they exist. Competition with herbaceous species can also inhibit the growth of seedlings as in the case of the evergreen oak *Quercus douglasii* (Gordon and Rice, 2000). As a consequence of these difficulties, artificial regeneration may be an important alternative for reforestation and rejuvenation of Cork oak stands.

In the Mediterranean region seedling establishment from direct sowing of cork oak acorns is often poor (Messaoudène, 1984; Sondergaard, 1991; Carvalho and Morais, 1996; Louro, 1999) as a result of consumption by rodents or deterioration by insects and fungal attack (Anderson, 1992; Fukumoto and Kajimura, 2000). Actually, the frequency of artificial regeneration through seedling plantation is increasing, but the problem of irregular acorn production is exacerbated by dormancy-related heterogeneity of germination in freshly harvested acorns (Merouani *et al.*, 2001). Therefore, acorn storage

to overcome dormancy may be a way to overcome the irregular acorn production and maintain a regular supply of acorns to nurseries, as well as to improving the uniformity of germination. We have demonstrated, however, that to maintain acorn viability and avoid their precocious germination during storage it is important to know the maturity of the acorns at harvest (unpublished data). The natural shedding of acorns coincides with complete maturity. Acorns left on the ground after shedding will either germinate relatively quickly or lose viability as a result of desiccation. Both are detrimental to a successful of storage. Although the physiology of acorn germination has been investigated, the regulation of acorn growth and the morphological and physiological changes, which occur during the early stages of embryogenesis, remained unclear. Côme (1974) distinguished two aspects of seeds maturity: morphological, characterised by changes pericarp color and seed moisture or seed size and physiological processes corresponding to physiological and biochemical changes, which are responsible for the seed germination. Depending upon species the physiological maturity can occur before, after or coincide with the morphological maturity (Côme 1974). Many studies (Handley *et al.*, 1983; Hoekstra and Roekel, 1988; Blackman *et al.*, 1991; Blackman *et al.*, 1992; Ooms *et al.*, 1993; Black *et al.*, 1999) have been conducted on various species to elucidate the acquisition of desiccation tolerance and the physiological or biochemical changes occurring during seed development. However, the precise time during maturation when tolerance is acquired depends on the species, the rate of water loss and the final water content after drying (Ellis and Hong, 1994; Wechsberg *et al.*, 1994; Hay and Probert, 1995). Although, the physiological regulation of desiccation tolerance induction is still poorly understood (Black *et al.*, 1999), the accumulation of soluble sugars (Handley *et al.*, 1983; Lowell and Kuo, 1989; Blackman *et al.*, 1991; Blackman *et al.*, 1992; Rinaldi *et al.*, 1994; Widders and Kwantes, 1995; Black *et al.*, 1999; Tauberger *et al.*, 1999) and proteins (Blackman *et al.*, 1992; Black *et al.*, 1999) is of major importance. Abscisic acid (ABA) is known to play a crucial role in seed maturation and acquisition of desiccation tolerance (Koornneef *et al.*, 1982; Bartels *et al.*, 1988).

The present work was aimed at the study of the morphological and physiological maturity pattern of cork oak acorns, in order to determine: (i) whether physiological maturity precedes or not the morphological maturity and (ii) which attribute might be an adequate estimate of seed maturity.

## Materials and methods

### *Site and harvest of acorns*

The study of seed maturation process was conducted in 1999 on 4 trees at Herdade de Palma (South of Portugal, 38°33'N, 8° 42'W, 566 mm annual rainfall and 16.4°C mean annual temperature). The relatively small number of trees was due to the poor acorn production in that year. Every second week, from September 27 to November 22 (1999) samples of about 200 acorns (except for the last harvest) were picked manually from the area equivalent to the crown projection of each tree and immediately transferred in to portable thermos chambers at 2-3°C to minimise the water loss during transport. All experiments were started within 24 h of harvest.

*Weight acorn distribution*

At each harvest the individual acorn fresh weight was recorded and then separated into weight classes. To minimise the variability within the same harvest and follow the characteristic changes during acorn development, all determinations were done within the median class whenever possible. When insufficient acorns fell into the median class acorns within the classes to the right and left of median class were included in the analyses.

*Moisture content determination*

Whole seed, pericarp, cotyledons and axis moisture contents (MC) were assessed during acorn development. The moisture contents of 10 individual samples of whole acorns or their components were determined gravimetrically by oven drying for 17 h at  $103 \pm 1^\circ\text{C}$  (dry weight DW) (International Rules for Seed Testing 1985) and are expressed on a fresh weight (%FW) basis by the equation:  $\%MC = (FW-DW)/FW*100$ . The mean dry weight of whole acorns was used to follow the evolution of acorn weight during maturation. Taking into account the labour-intensive number of tests and the lack variability in embryo axis and cotyledon MC (Merouani *et al.*, 2001), the MC of trees number 2 and number 3 was only determined on the whole acorn.

*Germination tests*

Germination tests were performed at different harvests on 4 replicates of 25 seeds. Acorns were soaked for 48 h at  $20^\circ\text{C}$  and sterilised for 10 min by washing in 80% sodium hypochloride solution. Following pericarp removal, one third of the cotyledons at scar end of the acorn was cut off and the remained propagule placed in heat-sterilised sand soaked with a solution of Thiram (1.5 g/l). The germination test was at  $20^\circ\text{C}$  in the dark for a period of 28 days. Germination was assessed as radicle emergence of at least 5 mm and was recorded three times a week. The germination rate, the mean germination time (MGT) and the uniformity ( $T_{75-25}$ ) were analysed by the SeedCalculator software (CPRO, the Netherlands).

*Carbohydrate determination*

At each harvest, 3 replicates of 6-8 pooled acorns were analysed for carbohydrate concentration. Samples of cotyledons and embryonic axis were frozen in liquid nitrogen immediately after excision and stored at  $-80 \pm 2^\circ\text{C}$  until determination. Samples of 50 to 60 mg (cotyledons) and 10 to 20 mg (embryonic axis) were ground in a mortar and extracted twice with 70% ethanol. The total concentration of soluble sugars was determined according to the anthrone method, as developed by Jermyn (1975). The residue was then analysed for starch by re-suspending two times in 1 ml of 1.1% chloridric acid. The concentration of carbohydrates was expressed on a dry weight basis.

*Statistical analysis*

A one-way analysis of variance was performed to evaluate the variability of different parameters between trees at full acorn maturity by performing the Tukey's multiple comparison procedure. To compare the DW and the MC of acorns picked from trees at full maturity with those picked from the ground, Dunnett's test versus control was used.

## Results

### *Morphological characteristics*

#### *Acorn mass*

Figure 1 shows the increase in whole acorn fresh weight (FW) and figure 2 the dry weight (DW) of a sample of the median class. Acorn DW increased progressively in all trees from the beginning (September 27) and reached its maximum (2 g) between October 11 and November 08 (figure 2). After the maximum dry weight was reached, a majority of acorns dropped from trees numbers 3, 2 and 4. In the case of tree number 1, all acorns fell at this stage. The acorns left on the trees during this period were lighter. The comparison between the DW of acorns (trees 2 and 4) picked from the ground on November 22 (data not shown) and the maximum DW of acorns picked on the trees showed no significant differences ( $P=0.280$ ). This trend is also shown by the increase in median class fresh weight during acorn development (figure 1A, B, C, D). For acorn DW, no significant differences were found between acorns picked on the ground and those freshly harvested at their maximum size ( $P=0.149$ ). The acorn FW of all trees were normally-distributed and this was particularly well defined at the latest harvests, except in the case of tree number 4 at first harvest (figure 1A, B, C, D).

There were differences in the color of the pericarp between trees. On October 25, more than 35% and 48% of acorn harvested from trees number 1 and number 3 respectively already had brown pericarps, whereas for trees number 2 and number 4 the pericarp remained green until November 08 when 54% and 27%, respectively had turned brown.

#### *Moisture content*

The MC of the whole acorn decreased progressively during development in all trees sampled, reaching a steady content of about 50% in trees number 2 and number 4 in November 08 (figure 3A). No significant difference ( $P=0.381$ ) was observed between the two last harvests. The MC of acorns picked from the ground on November 22 was about 47% for the two trees (data not shown) and no significant differences were found between trees ( $P=0.432$ ) and between acorns picked from the ground and those picked from the trees ( $P=0.361$ ) in the same date. Meanwhile the MC of acorns of trees number 1 and number 3 remained high and was about 59% and 63%, respectively on October 25 (figure 3A).

The pattern and rate of dehydration differed greatly among acorn tissues, but slightly between the two trees considered (trees 1 and 4) (figure 3B, C, D). In fact, the pericarp showed a relative smaller water loss during acorn development (5% to 8%) than the embryo axis (16% to 25%) and the cotyledons (28% to 36%). The latter showed a rapid dehydration, especially on tree number 1 (figure 3D). At the last harvest (October 25), the MC of cotyledons and embryos of tree number 1 (figure 3D and B) were the same as those of the tree number 4 at the fourth harvest (November 08) ( $P=0.802$  and  $P=0.814$ , respectively); while the pericarp MC remained high and significantly different ( $P=0.012$ ). At each harvest, the axis had a higher MC than the cotyledons. At full maturity, the MC of the pericarp varied between trees and ranged between 66% to 60%, while the MC of the embryo axis and the cotyledon was about 58% and 43%, respectively.

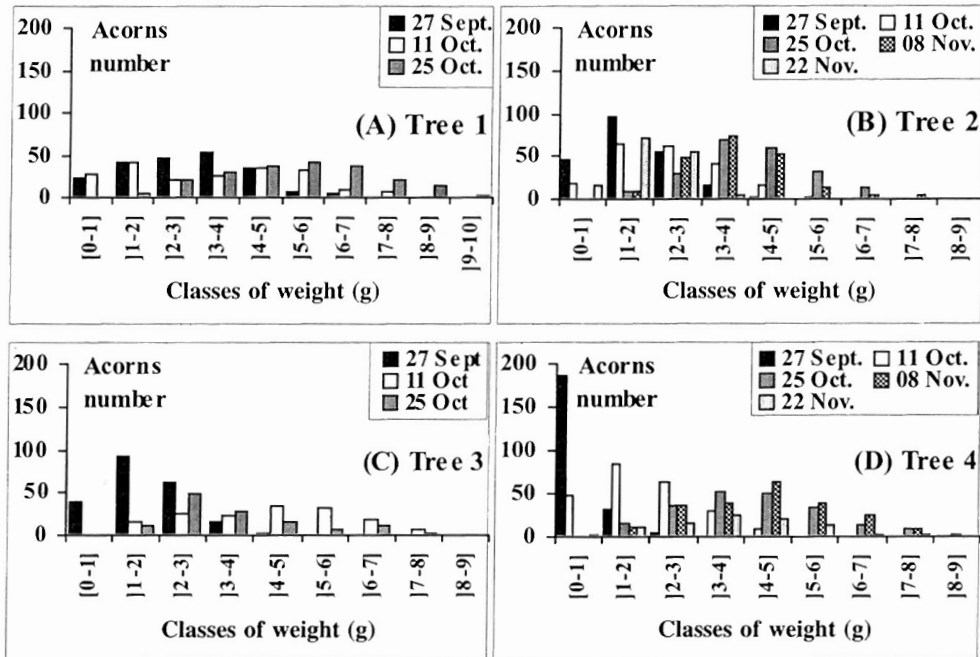


Figure 1. Distribution and changes of acorn fresh weight of four trees sampled during maturation process. About 200 acorns were picked at each harvest.

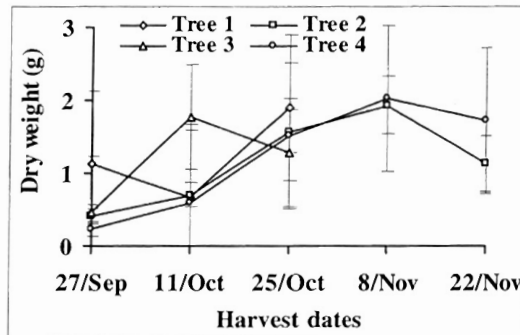


Figure 2. Changes of acorn dry weight of four trees sampled during maturation process. Values are mean  $\pm$  SE, 10 individual acorns considered within the median class.

In order to evaluate the variation in MC proportions of the different tissues we plotted pericarp and cotyledon DW vs. whole acorn FW in maturing acorns of trees number 1 and number 4 (figure 4). The acorn size varies within tree and between the two trees. For most harvests a strong linear correlation between cotyledon DW and acorn FW was obtained for the two trees. In contrary, pericarp DW was relatively, poorly correlated with acorn FW. The cotyledons amounted to 70-80% of total acorn dry weight, whereas the pericarp amounted to 20-30% and the embryo axis to less than 1%.

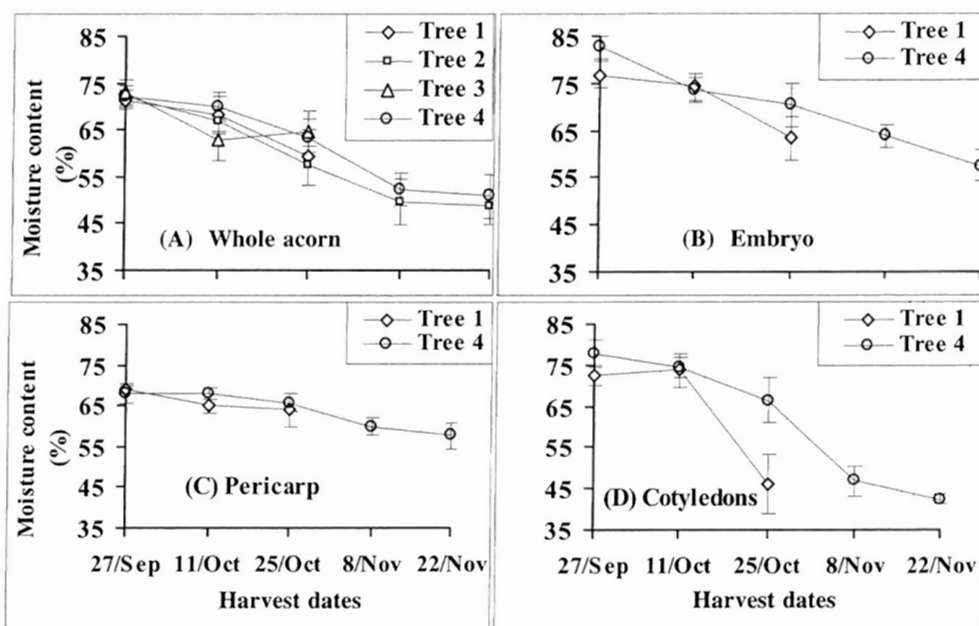


Figure 3. Changes of whole acorn (A), embryo axis (B), pericarp (C) and cotyledon moisture content during maturation process. Values are mean  $\pm$  SE, 10 individual acorns considered within the median class.

### Physiological characteristics

#### Seed germination

The germination improved progressively during acorn maturation in all trees (figure 5). Moreover, the mean germination time (MGT) decreased during the same period (figure 6). At the first harvest (September 27) acorn germination varied from about 82% (tree number 1) to 20% (trees number 2 and number 3) (figure 7). The germination of acorns of tree number 4 started afterwards no germination was observed at first harvest, in September 27 and reached 40% by the second harvest (October 11) (figure 7). The germination and the MGT of the tree number 4 was significantly different from the others trees ( $P < 0.001$ ).

#### Carbohydrate changes

Figure 8 shows starch and soluble sugar concentrations during acorn development of trees number 1, 2 and 4. Because of insect attack the acorns of tree number 3 were not considered in this experiment. The embryonic axis starch of acorns of trees number 1 and 4 increased from the first harvest (September 27) until October 11 and October 25, respectively, reaching about  $500 \text{ mg.g}^{-1} \text{ DW}$ . Thereafter, it declined during the later harvests. A steady state of embryonic starch concentration was already observed by October 25 followed by a decrease in tree number 2 (figure 8A).

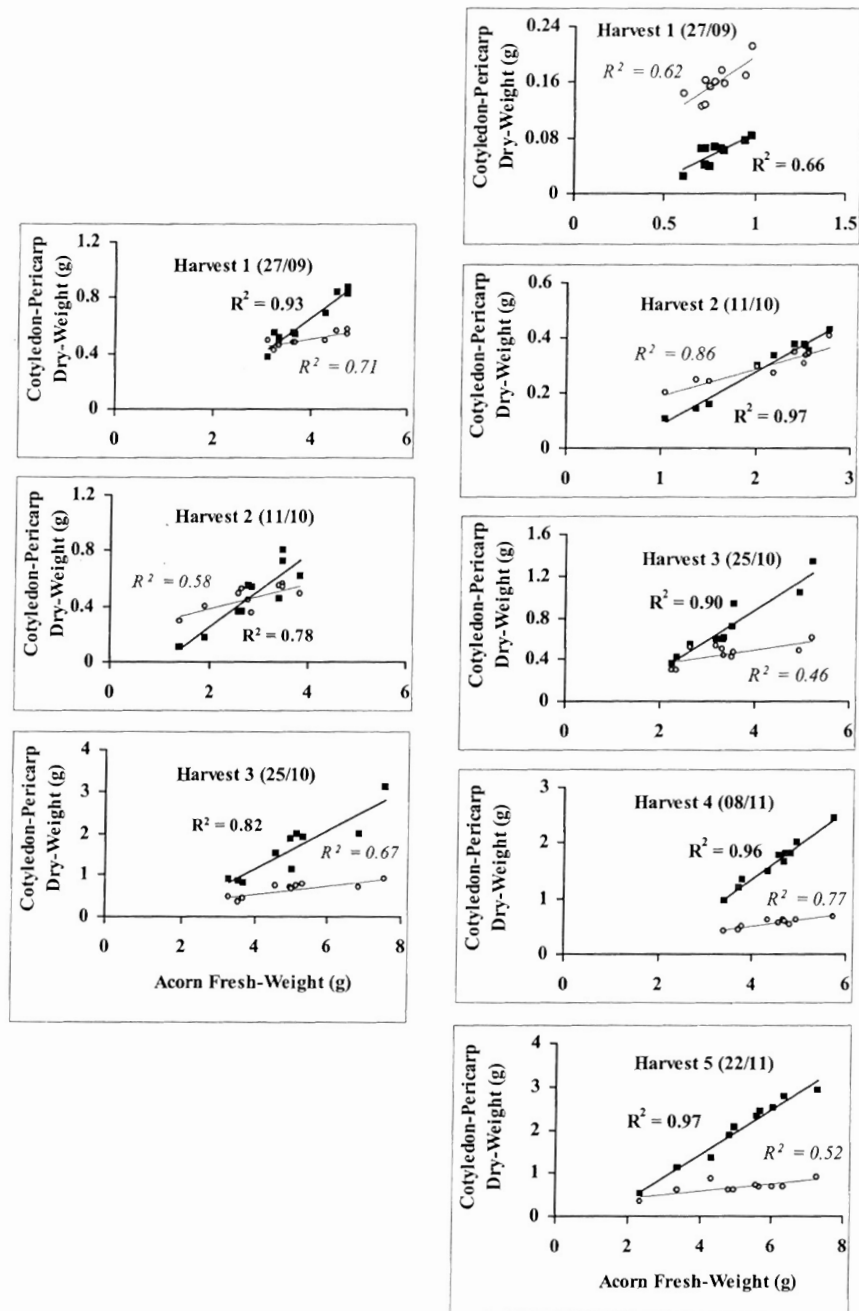


Figure 4. Correlation between acorn fresh weight/cotyledon dry weight (■,  $R^2$ : bold) and acorn fresh weight/pericarp dry weight (○,  $R^2$ : italic). 10 individual acorns considered within the median class. Tree number 1: left; tree number 4: right.

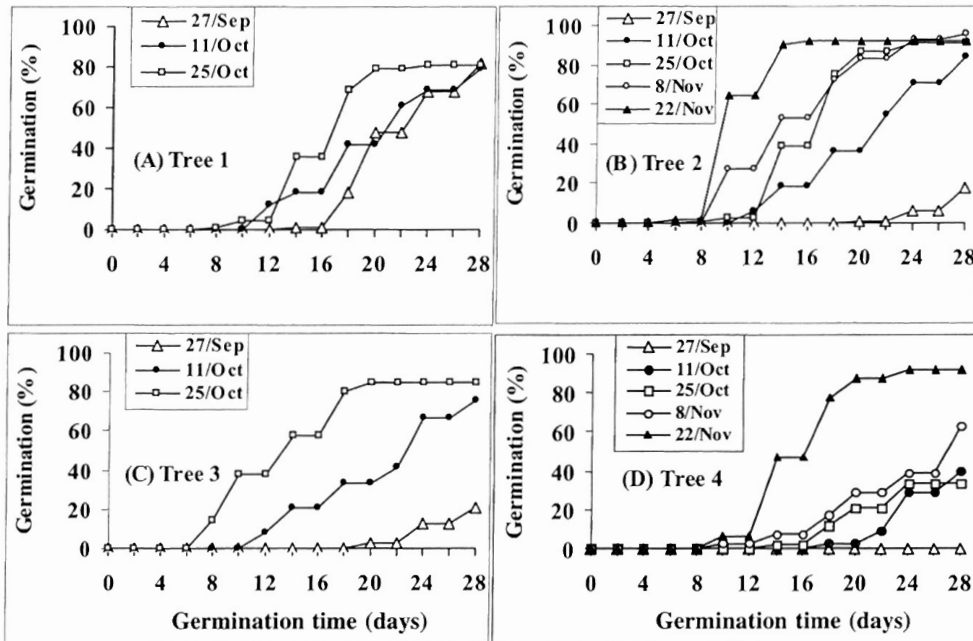


Figure 5. Change of germination capacity of acorns picked from the trees at different time during maturation process. Values are mean for 4 replicates of 25 seeds each. SE values are omitted for clarity.

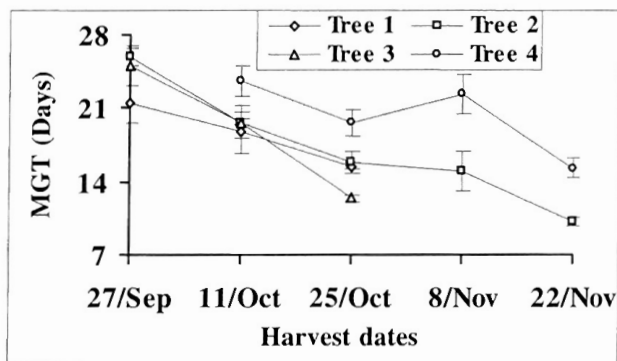


Figure 6. Change of mean germination time (MGT) of acorns picked from the trees at different time during maturation process. Values are mean  $\pm$  SE, for 4 replicates of 25 seeds each.

The soluble sugar concentration of the cotyledons decreased dramatically from the first harvest to October 25 (trees number 1 and number 2) or to November 8 (tree number 4) reaching a steady state of about 100 mg.g<sup>-1</sup> DW (figure 8B). The concentration of soluble sugars of the embryonic axis increased early during maturation (September 27 to October 11), reached about 200 mg.g<sup>-1</sup> DW and remained constant or declined slightly (e.g., tree number 2) (figure 8C).

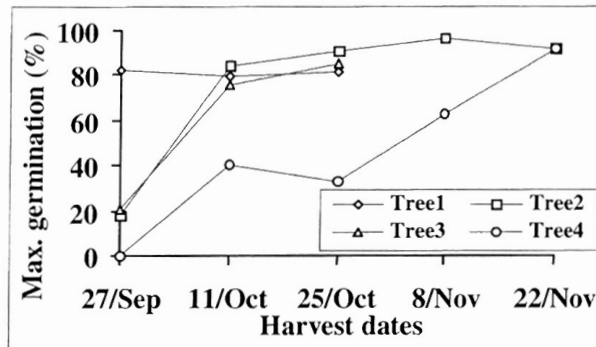


Figure 7. Change of maximum germination of acorns picked from the trees at different time during maturation process. Values are mean, for 4 replicates of 25 seeds each.

## Discussion

During the maturation process the dry weight of acorns increased to reach a full size varying with parental trees. Dry weight decreased if the acorns turned brown or remained attached to the tree for a while if they did not (still green). Usually when acorns start dropping, most of these remaining on the tree are ripe and fall massively with the slightest wind. The acorn shedding period varied between trees as shown by the decline of the weight harvested (tree numbers 2 and number 4) or no harvest (tree number 1) in November 8. Even though the number of trees sampled was small, it seems that the complete maturation of cork oak acorns was attained between November 08 and November 22. Likewise, the full maturation of acorns collected at Faro (located further South from our experimental site) occurred between 17 and 19 November (data not shown), although the time of ripeness may vary with location and weather conditions.

The fact that the full crop of acorns was shed simultaneously (or almost simultaneously) when they turned brown means that the majority of acorns of a tree were in the same maturity state. This was reinforced by the normal distribution of acorn weight, which is common of most oak populations (Wigston, 1971 *in* Brookes and Wigston, 1979). The maturation process is characterised by the progressive acorn dehydration. The dehydration rate during maturation differed greatly between seed tissues. The pericarp and the embryo axis showed a relative weaker water loss than the cotyledons. A slow rate of water loss in both tissues could be a strategy against membrane damage of the embryonic tissues during the natural dehydration, whereas the more intense water loss in the cotyledons might be related to the use of water in hydrolytic reactions such as starch and sucrose hydrolysis (Kozłowski and Pallardy, 1997).

It is known that most of the energy and carbon for further embryo growth comes from the breakdown of starch to glucose that occurs in the cotyledons (Perumalla *et al.*, 1994). We found that starch and sucrose were the major carbohydrates in the cotyledons of cork oak acorns (unpublished data).

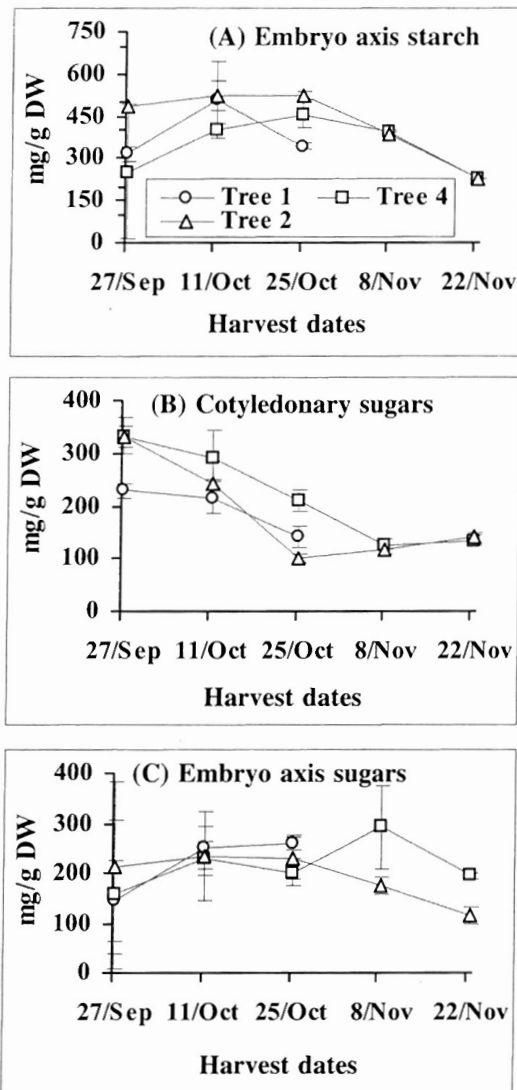


Figure 8. Change of embryo axis starch (A), cotyledons sugars (B) and embryo axis sugars (C) during acorn maturation. Values are mean  $\pm$  SE, for 3 replicates of 6-8 pooled acorns each.

Acorns were shed at high MC and varied only slightly among parental trees. In a previous study on 12 individual trees we showed that most of the trees had the same acorn MC (44–47%) and only two trees differed significantly (51% MC) (Merouani *et al.* 2001). At time of shedding the MC of cotyledons was about 46% and that of the embryos was about 63%, whereas the MC of the pericarp ranged between 59 to 65%. A good correlation of cotyledon DW and a poor correlation of pericarp DW with whole

acorn FW suggest that, although the acorn weight (size) may differ, the proportions of water content of the cotyledons are the same, whereas the MC of the pericarp may differ greatly among acorns of the same harvest. This could be due to differences in testas thickness as found by Brookes and Wigston (1979) for *Quercus petraea* and *Q. robur*. Therefore, the variability in acorn MC between parental trees appears to be due to the pericarp MC, which represents 25 to 30% of the total acorn DW. Ysard (1987) found that the morphological immaturity of acorns of *Q. pubescens* and *Q. coccifera* resides in their pericarp, which show a relative high moisture content. The same trend has found by Finch-Savage (1992) who showed that pericarp-induced restriction of germination of fruit of *Q. robur* is related to the date of shedding. Due to the low MC variability and a large DW proportion, the MC of the cotyledons was found to be a good indicator of morphological maturity.

The germination capacity of acorns improved progressively during natural desiccation and reached their maximum capacity before shedding. These suggest that the physiological maturity is more precocious than the morphological maturity. In fact, maximum germination occurs 2 weeks or more before morphological maturity (figure 7). The accumulation of starch and soluble sugars in the embryonic axis during the two first harvests suggests that the physiological maturity occurred early during maturation drying and is complete when the acorns MC has decreased from 72% to 67% for all trees, except tree number 4. The maturity period may differ between trees, but it has been demonstrated that the acorns of a large number of trees accomplish their maturity within the same period and occurs between November 15 to November 30 in the southern localities of Portugal (Merouani *et al.*, 2001). However, at each harvest there was a large variation in mean germination times of seeds (pericarp removed) of different trees and decrease during acorn development. This suggest that level of dormancy, varied among parental trees and declined with acorn maturation. Finch-Savage *et al.* (1992) suggested that the dormancy is partially controlled by ABA and found that axis ABA concentration was initially high and then declined as the time of shedding approached.

Desiccation tolerance in seeds is initiated approximately when mass maturity is reached, approximately when maturation drying occurs (Bartels *et al.*, 1988; Ellis and Hong, 1994; Hay and Probert, 1995). However, the precise time during maturation when desiccation tolerance is acquired depends on the species, the rate of water loss and the final water content after drying (Hong and Ellis, 1992; Ellis and Hong, 1994; Hay and Probert, 1995). Physiological regulation of the induction of desiccation tolerance is poorly understood, but one suggestion is that vascular isolation of the developing seeds is of major importance (Galau *et al.*, 1991) followed by incipient water loss. To withstand desiccation cells must be protected against potentially lethal changes that could follow dehydration. Mechanisms by which this might be achieved include the participation of certain carbohydrates (Handley *et al.*, 1983; Lowell and Kuo, 1989; Blackman *et al.*, 1991; Blackman *et al.*, 1992; Rinaldi *et al.*, 1994; Vertucci and Farrant, 1995; Black *et al.*, 1999; Tauberger *et al.*, 1999). Therefore, it seems that *Q. suber* acorns tolerate the natural desiccation and it acquired early in development stage, when the sugars of the embryonic axis increased between September 27 and October 11 (figure 8C). However, the sugars accumulation alone is not sufficient to confer desiccation tolerance in developing seeds.

We have observed (unpublished data) that germination of mature acorns was greatly affected when they are dehydrated below 36% MC and they lost viability at a critical MC of about 30%. This suggests that mature acorns of *Q. suber* are desiccation-sensitive. One of the suggested functions of carbohydrates is membrane protection upon dehydration. Hoekstra *et al.* (1991) have showed that carbohydrates can suppress the temperature of phospholipid phase transitions and prevent leakage of cellular solutes. In addition, carbohydrates are involved in the stabilisation of proteins and retention of enzymic activity during dehydration (Carpenter and Crowe, 1988). A second mechanism in which soluble sugars are thought to be involved is in glass formation against membrane damage (Vertucci and Farrant, 1995). The protective role of sucrose and raffinose against membrane vesicle damage during desiccation was demonstrated by Caffrey *et al.* (1988). The sucrose may be withheld from exerting protective effects because of its tendency to crystallise, especially at low MC and the presence of an oligosaccharide, such as raffinose, can assist by restricting or preventing the crystallisation of sucrose (Caffrey *et al.*, 1988). Hoekstra and Roekel (1988) studying the changes in composition of phospholipid, as regulatory to the physical properties of the membrane and the functioning of enzymes of membrane conclude that a production of sucrose is responsible for pollen survival during dehydration. In a previous study (Merouani *et al.*, 2001) we have observed that the sucrose is the major soluble sugars (78.6 mg.g<sup>-1</sup> DW) in the embryo of acorns freshly harvested.

### Acknowledgements

The authors wish to thank the European Commission for having provided funds to conduct that research within contract FAIR5-CT97-3480. We are also grateful to the technician staff of Association of Forest Producers (ANSUB, Alcácer do Sal).

### References

- Anderson, C. (1992). The effect of weevil and fungal attacks on the germination of *Quercus robur* acorns. *Forest and Ecology Management*, **50**, 247–251.
- Anonymous (1998). Actes du Séminaire Méditerranéen sur la Régénération des Forêts de Chêne Liège. (1998). Tabarka, du 22 au 24 Octobre 1996. *Annales de l'INRGREF, Numéro spécial*. p 253.
- Bartels, D., Singh, M. and Salamini, F. (1988). Onset of desiccation tolerance during development of the barley embryo. *Planta*, **175**, 485–492.
- Black, M., Corbineau, F., Gee, H. and Côme, D. (1999). Water content, raffinose and dehydrins in the induction of desiccation tolerance in immature wheat embryos. *Plant Physiology*, **120**, 463–471.
- Blackman, S., Obendorf, R.L. and Leopold, A.C. (1992). Maturation protein and sugars in desiccation tolerance of developing soybean seeds. *Plant Physiology*, **100**, 225–230.
- Blackman, S., Wettlaufer, S.H., Obendorf, R.L. and Leopold, A.C. (1991). Maturation protein and sugars associated with desiccation tolerance in soybean. *Plant Physiology*, **96**, 868–874.
- Brookes, P.C. and Wigston, D.L. (1979). Variation of morphological and chemical characteristics of acorns from populations of *Quercus petraea* (Matt.) Liebl., *Q. robur* L. and their hybrids, *Watsonia*, **12**, 315–324.
- Caffrey, M., Fonseca, V. and Leopold, A.C. (1988). Lipid-Sugar Interactions. *Plant Physiology*, **86**, 754–758.
- Carpenter, J.F. and Crowe, J.H. (1988). Modes of stabilization of a protein by organic solutes during desiccation. *Cryobiology*, **25**, 459–470.

- Carvalho, J.B. and Morais, C.J.E. (1996). Análise da florestação em Portugal 1966-1995. Reunião de Especialistas em Reabilitação de Ecossistemas Florestais Degradados. Instituto Florestal. Lisboa, Portugal.
- Come, D. (1974). Quelques problèmes de terminologie concernant les semences. In *Germination des semences*. Eds Gauthier-Villars. Paris, pp 45-57.
- Croizeau, D. and Roguet, M. (1976). Faculté de reprise de glands prélevés en forêt après germination. *Revue Forestière Française*, XXVIII 4, 275-279.
- Ellis, R. and Hong, T.D. (1994). Desiccation tolerance and potential longevity of developing seeds of rice (*Oryza sativa* L.). *Annals of Botany*, 73, 501-506.
- Finch-Savage, W.E. (1992). Seed development in the recalcitrant species *Quercus robur* L.: germinability and desiccation tolerance. *Seed Science Research*, 2, 17-22.
- Finch-Savage, W.E., Clay, H.A., Blake, P.S. and Browning, G. (1992). Seed development in the recalcitrant species *Quercus robur* L.: Water status and endogenous abscisic acid levels. *Journal of Experimental Botany*, 43, 671-679.
- Frochot, H., Picard, J.F. and Dreyfus, Ph. (1986). La végétation herbacée obstacle aux plantations. *Revue Forestière Française*, XXXVIII 3, 271-278.
- Fukumoto, H. and Kajimura, H. (2000). Effects of insect predation on hypocotyl survival and germination success of mature *Quercus variabilis* acorns. *Journal of Forestry Research*, 5, 31-34.
- Galau, G.A., Jakobsen, K.S. and Hughes, D.W. (1991). The controls of late dicot embryogenesis and early germination. *Physiology Plantarum*, 81, 280-288.
- Gordon, D.R. and Rice, K.J. (2000). Competitive suppression of *Quercus douglasii* (Fagaceae) seedling emergence and growth. *American Journal of Botany*, 87, 986-994.
- Handley, L.W., Pharr, D.M. and McFeeters, R.F. (1983). Carbohydrate changes during Maturation maturation of Cucumber Fruit: implications for sugar metabolism and transport. *Plant Physiology*, 72, 498-502.
- Hay, F.R. and Probert, R.J. (1995). Seed maturity and the effects of different drying conditions on desiccation tolerance and seed longevity in foxglove (*Digitalis purpurea* L.). *Annals of Botany*, 76, 639-647.
- Hoekstra, F.A. and Roekel, T.V. (1988). Desiccation tolerance of *Papaver dubium* L. pollen during its development in the anther. Possible role of phospholipid composition and sucrose content. *Plant Physiology*, 88, 626-632.
- Hoekstra, F.A., Crowe, J.H. and Crowe, L.M. (1991). Effect of sucrose on phase behavior of membranes in intact pollen of *Typha latifolia* L., as measured with Fourier transform infrared spectroscopy. *Plant Physiology*, 97, 1037-1079.
- Hong, T.D. and Ellis, R.H. (1994). Development of desiccation tolerance in Norway maple (*Acer platanoides* L.) seeds during maturation drying. *Seed Science Research*, 2, 169-172.
- International Rules for Seed Testing. (1985). Determination of moisture content. *Seed Science and Technology*, 13, 338-341.
- Jermyn, M.A. (1975). Increasing the sensibility of the anthrone method for carbohydrates. *Annals of Biochemistry*, 68, 332-335.
- Koorneef, M.M.L., Jorna, D.L.C., Brinkhorst-van der Swan, D.L.C. and Karssen, C.M. (1982). The isolation of abscisic acid (ABA)-deficient mutants by selection of induced revertants in non-germinating gibberellin-sensitive lines of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiology*, 90, 463-469.
- Kozłowski, T.T. and Pallardy, S.G. (1997). Growth control in woody plants. Physiological ecology series. Eds. H.A. Mooney, *Academic Press USA*, p 641
- Louro, G. (1999). Avaliação da aplicação de programas de apoio à floresta na região do algarve. Direcção Geral das Florestas (DGF-Lisboa), Portugal, p 29.
- Lowell, C.A. and Kuo, T.M. (1989). Oligosaccharide metabolism and accumulation in developing Soybean seeds. *Crop Science*, 29, 459-465.
- Merouani, H., Acherar, M. and Istanbouli, A. (1998). Recherche de quelques contraintes biotiques et abiotiques à la régénération naturelle du chêne liège *Quercus suber* L.. Séminaire Méditerranéen sur la Régénération des Forêts de Chêne Liège. Tabarka, du 22 au 24 Octobre 1996. *Annales de l'INRGREF.*, Numéro spécial, 225-243.
- Merouani, H., Branco, C., Almeida, M.H. and Pereira, J.S. (2001). Comportement physiologique des glands de chêne liège (*Quercus suber* L.) durant leur conservation et variabilité inter-individus producteurs. *Annals of Forest Science*, 58, 143-153.
- Messaoudène, M. (1984). Résultats des essais de semis directs du chêne liège à Melata, Rapport interne, Institut National de Recherche Forestière (INRF-Algérie), p 10.

- Ooms, J.J.J., Léon-Kloosterzil, K.M., Bartels, D., Koornneef, M. and Karssen, C.M. (1993). Acquisition of desiccation tolerance and longevity in seeds of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiology*, **102**, 1185–1191.
- Perumalla, C.J., Hellebust, J.A. and Goldman, C.A. (1994). Invertase activity in root growth. *In* Tested studies for laboratory teaching. Eds. C.A. Goldman. University of Toronto, **15**, 93–108.
- Rinaldi, L.M.R., Menabeni, D., Lambardi, M. and Cimato, A. (1994). Changes of carbohydrates in olive seeds (*Olea europaea* L.) during fruit maturation and their correlation with germination. *Acta Horticulturae*, **356**, 58–61.
- Sondergaard, P. (1991). Essais de semis du chêne liège *Quercus suber* L. dans la forêt de Bab-Azhar, une subéraie de montagne au Maroc. *Annales de la Recherche Forestière au Maroc*, **25**, 16–29.
- Tauberger, E., Hoffmann-Benning, S., Fleischer-Notter, H., Willmitzer, L. and Fisahn, J. (1999). Impact of invertase overexpression on cell size, starch granule formation and cell wall properties during tuber development in potatoes with modified carbon allocation patterns. *Journal of Experimental Botany*, **50**, 477–486.
- Vertucci, C.W. and Farrant, J.M. (1995). Acquisition and loss of desiccation tolerance. *In* Seed development and germination. Eds. J. Kigel and G. Galili. New York, Marcel Dekker Inc, pp 237–271.
- Wechsberg, G.E., Bray, C.M. and Probert, R.J. (1994). Expression of 'dehydrin-like' proteins in orthodox seeds of *Ranunculus scleratus* during development and water stress. *Seed Science Research*, **4**, 241–246.
- Widders, I.E. and Kwantes, M. (1995). Ontogenic changes in seed weight and carbohydrate composition as related to growth of cucumber (*Cucumis sativus* L.). *Scientia Horticultura Horticultura*, **63**, 155–165.
- Ysard, D. (1987). Etude expérimentale de la germination de deux chênes méditerranéens : le chêne pubescent (*Quercus pubescens* Willd.) et le chêne Kermès (*Quercus coccifera* L.). *Thèse de 3<sup>e</sup> cycle*, Univ. Aix-Marseille.



ELSEVIER

Forest Ecology and Management 166 (2002) 159–164

Forest Ecology  
and  
Management

www.elsevier.com/locate/foreco

# Germination success, survival and seedling vigour of *Quercus suber* acorns in relation to insect damage

Manuela Branco<sup>\*</sup>, Carmen Branco, Hachemi Merouani,  
Maria Helena Almeida

Centro de Estudos Florestais, Instituto Superior de Agronomia, Tapada da Ajuda, 1399 Lisboa, Portugal

Received 16 August 2000; received in revised form 26 February 2001; accepted 31 May 2001

## Abstract

This study assesses the effects of damage caused by *Curculio elephas* Gyll. (Coleoptera: Curculionidae) and *Cydia splendana* Hb. (Lepidoptera: Tortricidae) on mature acorns of cork oak trees, *Quercus suber* L., in Portugal. The average number of insect-attacked acorns varied between 68, 44 and 17%, in three sites, respectively.

Acorns assorted into increasing damage classes had a decreasing acorn dry weight and a faster germination rate. The percentage of germination was very high (>90%) in all classes. Seedlings resulting from more intensely damaged acorns exhibited a slower growth rate and lower dry mass production than seedlings resulting from low damaged acorns.

© 2002 Elsevier Science B.V. All rights reserved.

**Keywords:** Insect-attack; Acorn germination; Seedling production

## 1. Introduction

In Portugal, the stands of cork oak (*Quercus suber* L.) occupy about 22% of the national forest, ranging from interior North to South, which represent 29% of world cork oak stands (Goes, 1991). In the context of the European Community Agriculture Policy (CAP), large areas (ca. 70,000 ha from 1994 to 1998) were reforested with cork oak in Southern Portugal, where a Mediterranean type of climate and degraded soils often put such effort at stake. Low survival rates (Louro, 1999) are due to inappropriate nursery and plantation

techniques and to the use of less desirable genetic material. The present study is part of a larger programme, which aims at developing methods to improve the production of seedling of high quality of *Quercus suber*. In this study, we determine the impact of insects, *Curculio elephas* Gyll. (Coleoptera: Curculionidae) and *Cydia splendana* Hb. (Lepidoptera: Tortricidae), damaging agents to cork oak acorns, by determining the effect of insect damage on germination success, seedling survival and seedling growth.

Several biotic factors damage acorns on oaks (Andersson, 1992; Herrera, 1995). Insects in particular, mainly weevils, tortricidae moths and cynipids, cause injury to acorns of many oak species (Oliver and Chapin, 1984; Kaushal and Kalia, 1989; Fukumoto and Kajimura, 2000). However, only a few studies describe their damage to cork oak acorns.

<sup>\*</sup> Corresponding author. Present address: Departamento de Engenharia Florestal, Instituto Superior de Agronomia, Universidade Técnica de Lisboa, Tapada da Ajuda, 1300-018 Lisboa, Portugal. Tel.: +351-21-3653382; fax: +351-21-3645000.  
E-mail address: mrbranco@isa.utl.pt (M. Branco).

## 2. Materials and methods

### 2.1. Acorn collection

Acorns were collected from the ground beneath trees in three cork oak stands, in the first 2 weeks of November 1999. Two stands were located in the South of Portugal, Alcácer do Sal (73–76 m above sea level at 38°33'N, 8°42'W) and Faro (300–350 m above sea level at 37°04'N, 1°15'W), and one stand on the North of Portugal, Alfândega da Fé (350 m above sea level at 41°20'N, 2°14'W).

To quantify the percentage of insect attack, about 300–500 acorns from each site were carefully opened in laboratory, by first removing the pericarp and then dissected, and examined, under a binocular microscope, for the presence of insects immediately after harvest.

To evaluate the influence of insect attack on seed quality and seedling vigour, acorns were sorted into four categories according to damage intensity caused by *Curculio elephas*: (1) non-infested, (2) with young larvae (first and second instars), (3) with older larvae (third and fourth instars) and (4) with exit holes. This was possible since the pericarp was removed before the germination trials (Section 2.3) and the galleries opened by larvae always start near the scar end of the acorns where the eggs are laid.

### 2.2. Seed moisture content and seed dry weight determination

Seed moisture content and seed dry weight were estimated from 15 acorns from each infestation group. On group (3) due to a low number of acorns available only eleven acorns were used.

Whole seed moisture content was determined by oven drying for 17 h at 103 °C (International Rules For Seed Testing, 1985). Fresh weight and dry weight were determined for each acorn. Moisture content is expressed on a fresh weight basis.

### 2.3. Germination tests

Germination tests were performed on 25 acorns with three replicates from each category of damage intensity. Before germination acorns were soaked for 48 h at 20 °C and sterilised by washing in 80%

sodium chloride solution. The pericarp was then removed and acorns were cut-off one-third at scar end and placed to germinate in the dark at 20 °C, in moist heat-sterilised sand, treated with a solution of the fungicide thiram (1.5 g/l) for 28 days. The presence of insects and their larval stage was determined by examining acorns when removing the pericarp. Germination was recorded every 2 or 3 days. Acorns were considered germinated when the radical protruded. The percentage of germination and the mean germination time (MGT) were determined for each replicate.

### 2.4. Seedling survival and vigour

After germination, 21 seeds from each group were transplanted to PVC tubes (50 cm × 4.5 cm in size) filled with sand and peat as substratum. Sowed seeds were placed in a controlled temperature chamber at 65% RH, 350 ppm CO<sub>2</sub>, 25 °C for 10 h per day light and 18 °C for 14 h per day dark. The substratum was wetted each second day to prevent desiccation. Seedling survival was evaluated using the percentage of seedlings that were successful in producing an emerged epicotyl and survived afterwards.

Seedling vigour was evaluated through stem height growth and number of leaves developed. Observations were taken weekly up to 105 days after transplant. After that period seedlings were harvested and separated into root and stem and leaf components. The dry mass was determined after drying at 80 °C for 48 h.

### 2.5. Statistical analysis

Differences between groups, in seed dry weight, moisture content, stem growth, number of leaves and seedling dry mass parameters, were tested in a one-way ANOVA factorial scheme. The Levene test was used to evaluate equality of variances. Whenever equality of variances was not accepted ( $\alpha = 0.05$ ) data was transformed by applying the logarithm transformation. Post-hoc comparison between group means was performed using Tukey's HSD multicomparison method. To compare percentage of germination and MGT between groups the non-parametric Kruskal–Wallis and Mann–Whitney *U*-tests were used.

### 3. Results

#### 3.1. Quantification of the insect infestation

Important differences among acorn provenance were observed in the percentage of infested acorns and the relative species abundance of pest insects collected from acorns. The average number of insect-attacked acorns varied between 68, 44 and 17%, in Alcácer do Sal, Faro and Alfândega da Fé, respectively. The lowest value was observed in the North of Portugal, where no acorn production was noticed in the previous year (1998). On the contrary, in the South of Portugal, an intermediate acorn production was observed in the previous year. The insects present in the acorns were primarily from two species: the weevil *Curculio elephas*, which occurred in 26, 42 and 85% of the infested acorns and larvae of tortricidae moths, mainly *Cydia splendana* (Table 1).

#### 3.2. Seed moisture content and seed weight

Results found significant differences among groups both for seed moisture content ( $F_{3,52} = 25.129$ ,  $P < 0.001$ ) and seed dry weight ( $F_{3,52} = 40.964$ ,  $P < 0.001$ ).

A significant decrease in dry weight and an increase in seed moisture content occurred with increasing damage intensity (Fig. 1). Dry weight losses in comparison to undamaged acorns were about 21% for acorns with young larvae, 54% for acorns with older larvae and 64% for acorns with holes. The means of the two first groups (1) and (2) are not significantly different ( $\alpha = 0.05$ ). However, these two groups differ from the groups with high damage intensity (3) and (4). For the variable dry weight, group (3) also is different from group (4) (Fig. 1).

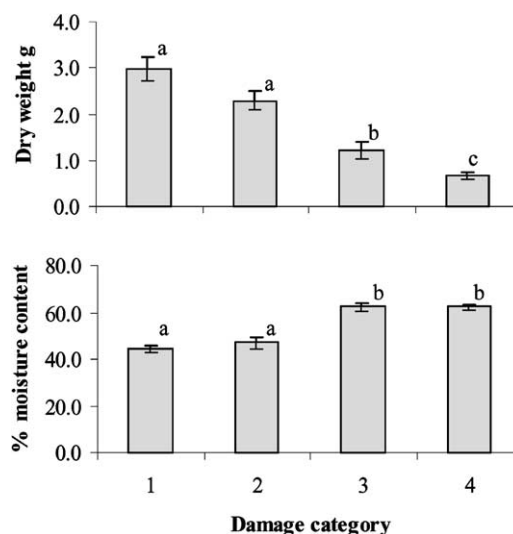


Fig. 1. Average ( $\pm$ S.E.) dry weight and average moisture content of *Quercus suber* acorns which sustained different degrees of insect damage. No damage: 1; acorns with young larvae: 2; acorns with old larvae: 3; acorns with holes: 4. Means followed by the same letter are not significantly different at  $P = 0.05$  (Tukey's HSD multicomparison test).

A significant negative correlation is found between dry weight loss and damage category ( $r_{sp} = -0.828$ ,  $P < 0.001$ ).

#### 3.3. Seed germination

Insect damage level caused a significant reduction in germination time (MGT) ( $X^2 = 10.385$ , d.f. = 3,  $P = 0.016$ ) Kruskal–Wallis test. Also, all paired groups were significantly different when compared by the Mann–Whitney  $U$ -test ( $\alpha = 0.05$ ) (Table 2). This is probably due to a decrease in the physical constraint for the radical as a consequence of endosperm consumption by the insects.

Table 1

Proportion of insect-attacked *Quercus suber* acorns and relative species abundance in Portugal

Locality	Harvest date	Number of acorns observed	Infested acorns (%)	<i>Curculio elephas</i> (%)	<i>Cydia splendana</i> (%)	Other tortricidae (%)
Alcácer do Sal	9 November 1999	334	67.9	26.2	66.9	6.9
Faro	17 November 1999	300	44.3	41.8	57.5	0.7
Alfândega da Fé	15 November 1999	485	16.9	85.2	11.4	3.4

Table 2

Mean germination time (MGT), germination percentage and seedlings dry mass parameters in the end of the experiment, 105 days after transplant, in *Quercus suber* acorns sorted into four groups according to insect<sup>a</sup> damage intensity (mean  $\pm$  S.E.)

Damage category <sup>b</sup>	MGT <sup>c</sup>	Germination <sup>c</sup> (%)	Stem and leaves dry mass <sup>d</sup>	Roots dry mass <sup>d</sup>	Ratio shoot/root dry mass <sup>d</sup>
1	10.72 $\pm$ 0.050 a	100 $\pm$ 0.00 a	0.58 $\pm$ 0.081 a	1.16 $\pm$ 0.088 a	0.16 $\pm$ 0.029 ab
2	8.2 $\pm$ 0.290 b	100 $\pm$ 0.00 a	0.32 $\pm$ 0.032 b	0.98 $\pm$ 0.109 a	0.11 $\pm$ 0.009 b
3	6.15 $\pm$ 0.117 c	94.67 $\pm$ 3.53 b	0.16 $\pm$ 0.014 c	0.29 $\pm$ 0.030 b	0.19 $\pm$ 0.015 a
4	4.53 $\pm$ 0.129 d	89.33 $\pm$ 4.81 b	0.12 $\pm$ 0.020 c	0.32 $\pm$ 0.069 b	0.14 $\pm$ 0.015 ab

<sup>a</sup> Mainly the weevil *Curculio elephas* and the moth larvae *Cydia splendana*.

<sup>b</sup> No damage: 1; acorns with young larvae: 2; acorns with old larvae: 3; acorns with holes: 4.

<sup>c</sup> Means followed by the same letter are not significantly different at  $P = 0.05$  (Mann-Whitney  $U$ -test).

<sup>d</sup> Means followed by the same letter are not significantly different at  $P = 0.05$  (Tukey's HSD multicomparison test).

The percentage of germination was very high (>90%) in all classes. Yet, a significant difference in the percentage of germination among categories of acorns was observed ( $X^2 = 7.99$ , d.f. = 3,  $P = 0.046$ ).

Acorns non-infested (class 1) and with young larvae (class 2) had significantly more acorns that germinated (100%) than the higher levels of damage (classes 3 and 4) (Table 2).

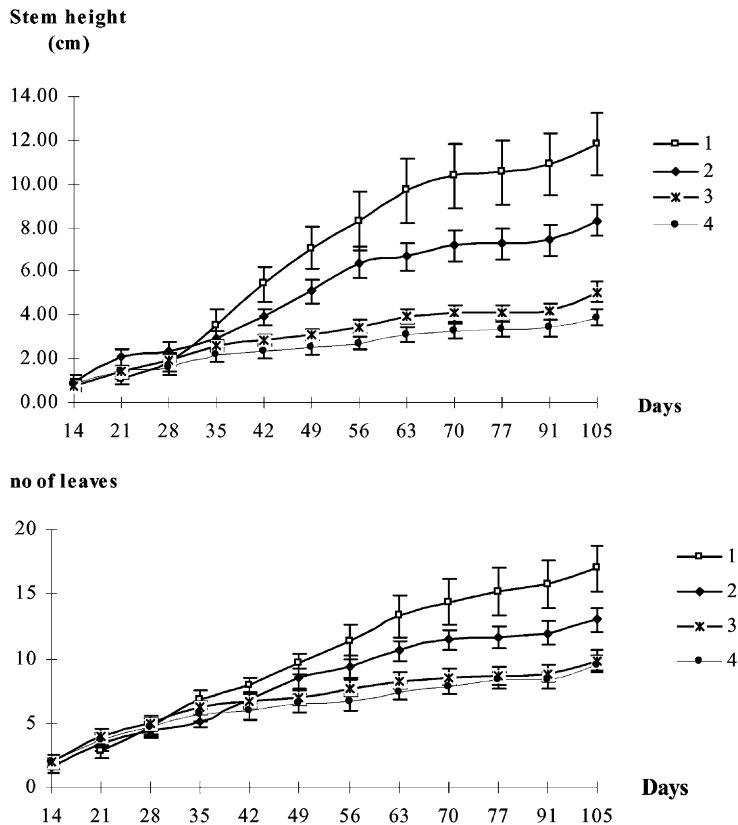


Fig. 2. Average ( $\pm$  S.E.) number of leaves (below) and stem height (above) of *Quercus suber* seedlings grown during 105 days and which originated from acorns with different degree of insect damage. Undamaged acorns: 1; acorns with young larvae: 2; acorns with older larvae: 3; acorns with holes: 4.

### 3.4. Seedling survival and vigour

Seedling survival was >90% for the (1), (2) and (3) damage categories. However, survival decreased to 77% in seedlings resulting from acorns with holes.

Significant differences were found for the stem growth and number of leaves at the end of the 105 days period in seedlings which developed from acorns with different degree of insect damage (Fig. 2), indicating a negative effect of the insect attack on seedling vigour ( $F_{3,75} = 20.204$  and  $8.69$ , for the stem growth and number of leaves, respectively,  $P < 0.001$ ). This negative influence is mainly visible in higher damage categories (classes 3 and 4) (Fig. 2). At the end of the experiment, seedlings in groups (3) and (4) were on average only  $5.07 \pm 0.43$  and  $3.89 \pm 0.37$  cm tall, respectively, whereas seedlings in group (1) were  $11.84 \pm 1.42$  cm tall. This means about 67% reduction in stem growth for the highest damage category in comparison with the non-infested group.

Similarly to the growth parameters, there was a significant decline in leaf and stem dry mass with increasing acorn damage (Table 2) ( $F_{3,75} = 24.404$  and  $31.424$ , respectively,  $P < 0.001$ ). Seedlings in group (4) had on average  $0.12 \pm 0.02$  g of stem and leaves dry mass and  $0.32 \pm 0.02$  g of roots dry mass, whereas seedlings in group (1) had  $0.58 \pm 0.08$  and  $1.16 \pm 0.09$  g of stem and leaves and roots dry mass, respectively. This signifies about 79 and 72% reduction in aerial dry mass and root dry mass, respectively, for the high damage category in comparison with the non-infested group. Yet, no significant differences were found for the ratio shoot/root dry mass between the non-infested acorns and the greatest damaged categories (groups (3) and (4)).

Therefore, it was evident that the feeding activity of larvae on acorns results in a negative effect on seedling vigour, but there is no effect in the balance of shoot/root dry mass.

## 4. Discussion and conclusions

The present study confirms the importance of insects on causing damage to acorns of *Q. suber*. Differences on the proportion of insect attacked acorns by site (17, 44 and 68%) are probably related to acorn production in the previous year. The lowest figure was

observed in the North of Portugal where a no acorn production occurred in the preceding year, whilst in the South an intermediate year of acorn production was noticed.

An increasing damage intensity caused a decrease in acorn dry weight, probably due to endosperm loss ( $r_{sp} = -0.828$ ,  $P < 0.001$ ). Weckerly et al. (1989) defined five categories for endosperm loss according to insect attacks: category 0 (no endosperm loss), category 1 (slight endosperm loss), category 2 (moderate endosperm loss), category 3 (large endosperm loss) and category 4 (complete endosperm loss). The four weight loss categories in this study (0, 21, 54 and 64%), which are related to larvae development, have a correspondence to the four first categories defined by Weckerly et al. (1989) to endosperm loss. The weight losses found in this study, due to insect attack, are higher than the ones reported from Montoya and Iranzo (1997) and Soria et al. (1997) for *Q. ilex* and *Q. suber*, respectively.

Laboratory observations indicate that eggs of *Curculio elephas* always were deposited in the lower part of the acorns. This result is consistent with similar findings for other insect on other host species, which has been attributed to chemical defence of the plant concentrating more tannins in the upper part of the acorns where the embryo is located (Steele et al., 1993). Thus, the larval feeding activity is concentrated on endosperm and seldom results in injury to the embryo and does not affect the capability of seeds to germinate. It was observed that damaged acorns had a very high percentage of germination, near 90% (Table 2). This is different to other *Curculio* species (Oliver and Chapin, 1984). Also our results differ to other *Quercus* species. Weckerly et al. (1989) found that acorns of *Q. alba* and *Q. rubra* with no endosperm loss included significant more acorns that germinated (82 and 98%, respectively) than acorn damaged by curculionid larvae, which had <8 and 1% of percentage of germination even for slight endosperm loss. However, in our study a lower seedling survival was registered when severe damage occurred (class 4), about 77 against 90% survival in undamaged acorns. This is consistent with the work of Fukumoto and Kajimura (2000) on acorns of *Q. variabilis* who indicate that hypocotyls and radicle survival is affected by high endosperm loss.

The MGT was lower for acorns with higher damage intensity. This result is possibly explained by a decrease in the physical constraint for radical protrusion as a consequence of endosperm consumption by the insects.

Previous studies deal mainly with seed germination and a few with hypocotyl and radicle survival. In this study, we also analysed the effects of insect damage to seedling vigour, as measured by stem growth, number of leaves and dry mass. Highly insect-damaged acorns produced less vigorous plants, with slower growth rate and less biomass. Yet the balance of shoot/root dry mass was not affected by insect-attack. In conclusion, acorns of *Q. suber* damaged by *C. elephas* and *Cydia splendana* have a relatively high germination rate and survival. However, due to endosperm loss, few reserves are available for seedling growth, which may result in poor quality seedlings. Thus, it is recommended that, besides acorn selection, acorn treatment, such as thermotherapy, should be used to prevent that infested acorns, frequently not easily perceptible, are used for seedling production.

### Acknowledgements

This work was supported by the project Fair-PL97-3480, co-ordinated by P. Belletti.

We wish to thank ANSUB (Associação dos Produtores Florestais do Vale do Sado) by the assistance provided on the field work.

### References

- Andersson, C., 1992. The effect of weevil and fungal attacks on the germination of *Quercus robur* acorns. For. Ecol. Manage. 50, 247–251.
- Fukumoto, H., Kajimura, H., 2000. Effects of insect predation on hypocotyl survival and germination success of mature *Quercus variabilis* acorns. J. For. Res. 5, 31–34.
- Goes, E., 1991. A floresta portuguesa. Sua importância e descrição das espécies de maior interesse. Portucel.
- Herrera, J., 1995. Acorn predation and seedling production in a low-density population of cork oak (*Quercus suber* L.). For. Ecol. Manage. 76, 197–201.
- International Rules For Seed Testing, 1985. Determination of moisture content. Seed Sci. Technol. 13, 338–341.
- Kaushal, B.R., Kalia, S., 1989. The effects of *Dicranoganathus nebulosus* (Coleoptera: *Atelabidae*) on acorns of *Quercus leucotrochophora*. Ecol. Entom. 14, 239–241.
- Louro, G., 1999. Avaliação da aplicação de programas de apoio à floresta na região do Algarve. Direcção-Geral das Florestas. Lisboa.
- Montoya, J.A.M., Iranzo, F.T., 1997. Efecto del ataque de *Balaninus elephas* Gyll. (Coleoptera: Curculionidae) Sobre la germinación y peso de la bellota de *Quercus ilex* L. 6ª Jornadas Científicas. Sociedad Española de Entomología Aplicada Lleida, p. 148.
- Oliver, A.D., Chapin, J.B., 1984. *Curculio fluvus* (Coleoptera: Curculionidae) and its effects on acorns of live oaks, *Quercus virginiana* Miller. Environ. Entomol. 13, 1507–1510.
- Soria, F.J., Cano, E., Ocete, M.E., 1997. Efectos del ataque de *Curculio elephas* (Gyllenhal) (Coleoptera: *Curculionidae*) en el fruto del alcornoque (*Quercus suber* Linné). 6ª Jornadas Científicas. Sociedad Española de Entomología Aplicada Lleida, p. 146.
- Steele, M.A., Knowles, T., Bridle, K., Simms, E.L., 1993. Tannins and partial consumption of acorns: implications for dispersal of oaks by seed predators. Am. Midl. Nat. 130, 229–238.
- Weckerly, F.W., Sugg, D.W., Semlitsch, R.D., 1989. Germination success of acorns (*Quercus*): insect and tannins. Can. J. For. Res. 19, 811–815.

## Le développement de champignons, un facteur limitant la conservation à long terme des glands de chêne-liège (*Quercus suber* L.)

Hachemi Merouani<sup>1</sup>, Roman Trubat<sup>2</sup>, Maria João Lourenço<sup>1</sup>, Teresa Sampaio<sup>1</sup>,  
Maria de Lourdes Santos<sup>3</sup>, Jordi Cortina<sup>2</sup>, João Santos Pereira<sup>1</sup>, Maria Helena Almeida<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Centro de Estudos Florestais, Instituto Superior de Agronomia (ISA), Tapada de Ajuda  
1349-047 Lisboa Cedex, Portugal, hmerouani@isa.utl.pt

<sup>2</sup> Depto. de Ecología. Universita de Alicante. Ap. 99 03080 Alicante, Spain

<sup>3</sup> Estação Florestal Nacional, Quinta do Marquês, Oeiras, Portugal

**Résumé:** Dans le cadre d'un accord entre le Centre de Recherche Forestière (ISA, Portugal) et l'Université d'Alicante, nous avons testé le comportement germinatif des glands de *Quercus suber* initialement traités par thérapie thermique et conservés durant 5 (5MC) ou 17 mois (17MC) à 0 °C et à 85% d'humidité relative. L'analyse morphologique et physiologique des glands a été faite à huit niveaux différents au cours du processus de germination, le niveau 0 (témoin) correspondant à la sortie des glands de la chambre de conservation. Les résultats montrent que le développement de champignons sur les glands de 17MC a entraîné une réduction significative de leur germination. En effet, au 16<sup>ème</sup> jour de germination 18% des glands 17MC présentaient des mycéliums, bien que 42% aient déjà germés. A la fin du test (28<sup>ème</sup> j), l'attaque fongique avait atteint des valeurs critiques de 40%. L'attaque est localisée au niveau des glands et non due à une contamination du substrat de culture. L'augmentation de la teneur en eau de l'embryon au cours de la germination et le test au tetrazolium des glands non germés ont montré que 75% des glands de 17MC étaient viables. Au contraire, aucune contamination n'a été notée sur les glands de 5MC, la germination étant significativement plus rapide et plus groupée ; elle atteignait 96% au 16<sup>ème</sup> jour. À la fin du test, 71% des glands 5MC avaient émis un épicotyle. La comparaison avec des résultats antérieurs permet de conclure à l'inefficacité de la thérapie thermique après plus de 12 mois de conservation.

**Mots-clés:** conservation des glands, germination, émergence des semis, champignons, *Quercus suber*

### Introduction

L'importance socio-économique et écologique du chêne-liège (*Quercus suber* L.) nous incite à augmenter les efforts en vue de la réhabilitation des subéraies. Les problèmes dont souffrent les subéraies sont encore nombreux et peuvent être divisés en deux groupes interdépendants.

Le premier, difficilement contrôlable, englobe les problèmes liés: *i-* à la physiologie et écologie de l'arbre, comme le vieillissement et l'irrégularité des glandées (Sork & Bramble, 1993), *ii-* aux contraintes biotiques et abiotiques empêchant la régénération naturelle (Lorimer et al., 1994; Herrera, 1995; ASMRFC, 1998), notamment la déprédation exercée sur les glands par les champignons et les insectes, et les conséquences de la sécheresse (Cabral et al., 1993; Crawley & Long, 1995; Fuchs et al., 2000), et *iii-* au dépérissement des peuplements. Ce dernier problème a attiré l'attention de nombreux chercheurs, et en particulier celle des phytopathologistes, au cours de ces dernières années. Les activités humaines (gestion, incendies, déboisement, pâturage, etc...), considérées comme l'une des principales causes de la régression des subéraies (ASMRFC, 1998), entraînent une fragilisation des peuplements qui deviennent des foyers de prédilection pour différents agents antagonistes (champignons, bactéries, insectes).

Le second aspect lié à l'insuccès de la reforestation peut être surmonté par un recours à la régénération assistée. La régénération du chêne-liège par voie séminale, qu'elle soit artificielle (semi-directe) (Messaoudene, 1984 ; Sondergaard, 1991 ; Louro, 1999) ou naturelle (Diáz-Fernandez & Gil Sanchez, 1998 ; Hasnaoui, 1998 ; Messaoudene et al., 1998) demeure problématique. La lenteur de germination des glands frais augmenterait le risque de mortalité (dessiccation, attaque fongique, insectes) ou/et de prélèvement par les rongeurs (Merouani et al., 2001a, b ; 2003). Durant les dernières décennies, la régénération des subéraies par plantation a pris une place importante dans les projets de repeuplement des différents pays méditerranéens (projets nationaux, européens et de coopération). Cependant, pour ne citer que le Portugal, les plantations réalisées dans la région Sud ont conduit à des mortalités de plus de 50% (Louro, 1999). La qualité des plants (Aussenac et al., 1988 ; Tinus, 1996 ; Girard et al., 1997 ; O'Reilly et al., 1999), mais aussi les sites de plantation (M.H. Almeida, com.pers.) conditionnent le succès des plantations.

Nous avons démontré que la qualité des plants (rapidité-uniformité de l'émergence, potentiel de croissance, réserves, biomasse, rapport tige/racine) est significativement améliorée par la conservation des glands (Merouani et al., 2001b) et que le choix de leur période de production, de leur âge mais aussi de l'époque de leur installation peuvent être contrôlés (Merouani et al., 2001a, b). Des travaux récents (non publiés) montrent que le comportement germinatif des glands conservés à long-terme (25 mois) est affecté par la prolifération des champignons dans le milieu de culture.

La présente étude vient confirmer cet effet négatif en démontrant que la faible capacité germinative des glands conservés est due aux champignons présents à l'intérieur des glands à leur sortie de la chambre de conservation et non à la contamination du milieu de culture, comme on le suspectait dans le précédent travail.

## **Matériel et méthodes**

### ***Matériel végétal et protocole expérimental***

Des lots de glands frais ont été récoltés à Herdade da Palma, Alcácer do Sal (Portugal) en novembre 2002 et 2003, traités par thermothérapie et conservés à 0°C et 85% d'humidité relative (HR) dans des sacs de polyéthylène (30 µm d'épaisseur, ≈3 kg/sac). Les caractéristiques climatiques du site de récolte, le mode de manipulation et de conservation des glands sont détaillés par Merouani et al. (2001a, c). En avril 2004, après respectivement 17 (17MC) et 5 mois (5MC) de conservation, 18 kg de glands (6 sacs, N ≈ 2200 glands) pour chaque traitement (17MC et 5MC) ont été retirés de la chambre de conservation en vue d'analyser leur comportement germinatif. A la sortie de la chambre, les glands ont été triés à vue et par flottement sur l'eau, pour éliminer ceux qui paraissaient inutilisables (pré-germés, vides, attaqués par les champignons). Seuls les glands intacts (sans rupture de péricarpe) ont été pris en compte dans l'expérimentation.

La capacité germinative des 2 lots de glands conservés a été étudiée 3 fois/semaine durant tout le processus de germination (28 jours), par des observations de leur état morphologique, le calcul du pourcentage de germination et la mesure de la teneur en eau du gland entier et de ses différentes composantes (péricarpe, cotylédons, axe embryonnaire). Au total, 8 étapes représentatives de ce processus ont été considérées. L'état physiologique des glands intacts (I=100%) est le niveau 0 (témoin T); les autres correspondent au moment où plus de 20% des glands ont atteint un état physiologique donné ou que ce dernier devient significatif (environ 50% des glands sont concernés) (Fig. 1).

### ***Teneur en eau***

La teneur en eau (TE) des glands entiers et de leurs composantes a été déterminée après 17h de séchage à  $103 \pm 1^\circ\text{C}$  (PS : poids sec) (ISTA, 1985). Trois répétitions de 25 (glands entiers) et de 10 glands (composantes) ont été utilisées. TE, exprimée par rapport au poids frais (PF), a été calculée par la formule:

$$TE(\%) = \frac{PF - PS}{PF} \times 100$$

### ***Germination***

La germination des lots de glands a été conduite sur 10 répétitions de 1 120 glands chacune. Les glands, d'abord imbibés pendant 48 heures à  $20^\circ\text{C}$ , sont désinfectés 10 à 15 mn dans une solution de chlorure de sodium à 80% puis mis à germer dans du sable stérile ( $200^\circ\text{C}/2\text{h}$ ), maintenu humide durant 28 jours à  $20^\circ\text{C}$  et à l'obscurité. Nous considérons qu'un gland germe dès que la radicule perce le péricarpe et montre un géotropisme positif. A la fin de l'expérience, la viabilité des glands (lot 17MC) non germés (glands intacts et glands à péricarpe à peine rompu) a été analysée par la méthode classique de tetrazolium (ISTA, 2003).

## **Résultats et discussion**

### ***Pertes de glands après 5 et 17 mois de conservation***

Les pertes totales apparentes (glands pré-germés, vides et attaqués) sont présentées dans le tableau 1. Elles sont plus importantes pour les glands 17MC (11% environ) que pour les 5MC (3%). Aucune contamination apparente n'est observée sur les glands de 5MC, alors que 3% des 17MC présentaient des mycéliums en surface. Cette infection, bien que faible, nous semble préoccupante. Elle montre un développement de champignons durant la conservation, bien qu'un traitement thermique (thermothérapie) préalable ait été appliqué contre *Ciboria basctiana* (Delatour, 1977 : Delatour & Morelet, 1979 ; Delatour et al., 1982). L'analyse des glands intacts juste à leur sortie de la chambre de conservationa montré que les champignons, apparaissant sous forme de petites tâches brunâtres, sont localisés principalement du côté basal des cotylédons (côté hile); un taux d'infection initial d'environ 30% (17MC) et 4% (5MC) a été noté (données non reportées). Bonnet-Masimbert & Muller (1993) ont tenté de comprendre l'apparition de champignons sur des glands conservés dans des sacs de polyéthylène sellés. Dans des conditions de faible teneur en  $[\text{O}_2]$  et de forte teneur en  $[\text{CO}_2]$ , on suspecte le développement de *Cylindrocarpon didymum* (Guthke & Spethmann, 1993). Cependant, nous n'avons observé aucun développement de champignons sur les glands conservés durant 12-13 mois (non publié). Ces résultats suggèrent que la thermothérapie est inefficace, même à  $44^\circ\text{C}$  durant 2 heures (Branco et al., 2002), au-delà d'une année de conservation en sacs de polyéthylène sellés.

Schröder (2002) a rapporté la fréquence des problèmes d'infection observés ces dernières années en Europe sur les glands de *Q. robur* et *Q. petraea* ; il l'explique par une plus grande extension des agents pathogènes ou par l'adaptation de certains d'entre eux aux fortes températures. En 2004, Schröder estimait (après 7 jours d'incubation, à l'obscurité et  $10-20^\circ\text{C}$ ) la présence à plus de 80% de *C. batschiana* et à 31-50% l'infection due à l'association bactéries-champignons sur les glands de *Q. robur*. En conditions favorables, *C. batschiana* peut détruire une grande proportion de glands durant la conservation (Delatour et al., 1982).

A cette infection apparente, s'ajoutent 5% de pertes dues à la déshydratation et 3% dues à la pré-germination des glands à l'intérieur des sacs de conservation. Le total de glands utilisables, après élimination de ceux présentant une rupture du péricarpe, avoisine 90% (17 kg) et 83% (15 kg) pour 5MC et 17MC, respectivement (Tab. 1).

Tableau 1. Quantité de glands perdus (pré-germés, attaqués par les champignons ou vides), à péricarpe rompu ou utilisables après 5 mois (5MC) et 17 mois de conservation (17MC)

N° sacs	Poids (kg)		Pré-germés (kg)		Infectés (kg)		Vides (kg)		Péricarpe rompu (kg)		Utilisables (kg)	
	5MC	17MC	5MC	17MC	5MC	17MC	5MC	17MC	5MC	17MC	5MC	17MC
1	3	3	0,1	0,1			0	0,1	0,1	0,1	2,8	2,5
2	3,1	3,1	0	0,1			0	0,1	0,3	0	2,7	2,4
3	3,1	3	0	0			0	0,2	0,3	0	2,7	2,4
4	3,1	3,1	0	0,1			0	0,4	0,2	0	2,9	2,4
5	3	3,1	0,1	0,1			0	0,1	0,3	0,1	2,7	2,7
6	3,1	3,1	0	0,1			0	0,2	0,3	0	2,8	2,8
Total (kg)	18,4	18,4	0,2	0,5	0,1	1	0	1,1	1,5	0,2	16,6	15,2
Total %	100	100	1,1	2,7	0,5	5,4	0	6,0	8,2	1,1	90,2	82,6

### *Comportement germinatif des glands conservés*

Les différences de comportement germinatif des lots de glands conservés (17MC et 5MC) sont présentées dans le tableau 2. Les plus importantes correspondent à l'apparition de champignons et à la faible capacité germinative des glands conservés durant 17 mois. En effet, 50% des glands 5MC ont émis une radicule ( $G < 5$ ) dès le 10<sup>ème</sup> jour de culture et 71% ont présenté une émergence d'épicotyle à la fin du processus de germination; aucune contamination par les champignons n'a été observée. Au contraire, au 16<sup>ème</sup> jour de culture, seuls 42% des glands 17MC avaient germé et 18% présentaient déjà des mycéliums de champignons. Ces derniers ont proliféré graduellement jusqu'à atteindre 38% des glands à la fin de l'expérience, rendant difficile le comptage de glands germés (Fig. 1). Avant que l'infection fongique ne prolifère dans le milieu de culture, on a constaté que l'apparition des mycéliums se limitait exclusivement aux glands, ce qui montre que l'origine de l'infection fongique est endogène et non exogène. Au cours de la germination, la température et l'humidité ont favorisé la croissance des champignons et la prolifération de l'infection initiale à l'ensemble du lot.

À la fin de l'expérience, l'analyse au tetrazolium des glands non germés du lot 17MC, comptabilisant 12% de I (intacts) et 22% de RP (rupture du péricarpe), a permis d'estimer à 25% le total des glands non viables (Tab. 2). Par conséquent, à la sortie de la chambre de conservation, 75% des glands étaient viables, donc aptes à germer et à donner une plantule.

Par ailleurs, l'augmentation significative de la teneur en eau (TE) de l'embryon (Fig. 2) au cours de la germination, signifie que les glands des 2 traitements sont métaboliquement actifs. Cette activité métabolique confirme la viabilité des glands 17MC. Néanmoins, elle est moins intense pour les glands 17MC que pour les 5MC. En effet, la TE de l'embryon augmente significativement après 2 jours de germination pour les glands de 5MC et après 10 jours pour les 17MC (Fig. 2).

Ces résultats suggèrent donc que la réduction du taux final de germination (42%) observée pour les glands 17MC était due principalement à la prolifération de l'infection fongique dans le milieu de culture.

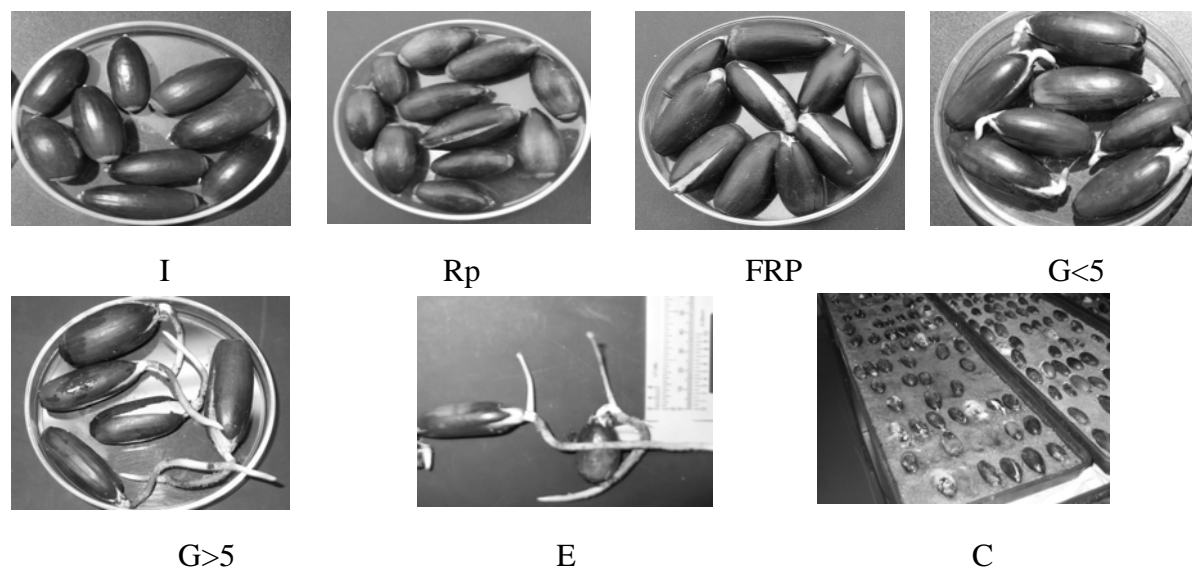


Figure 1. Les différents états physiologiques des glands durant le processus de germination. I: Intact; RP: Rupture du péricarpe; FRP: Forte rupture du péricarpe; G<5: Germination (radicule < 5 mm); G>5: Germination (radicule >5 mm); E: Emergence; C: Champignons.

Tableau 2. Niveaux (N) et pourcentage de glands conservés (5MC et 17MC) ayant atteint un état physiologique donné durant le processus de germination.

I: Intact; **RP**: Rupture du péricarpe; **FRP**: Forte rupture du péricarpe; **G<5**: Germination (radicule < 5 mm); **G>5**: Germination (radicule >5 mm); **E**: Emergence; **C**: Champignons. Les états soulignés interviennent dans la détermination de TE et des autres paramètres biochimiques

	Imbibition (20-25°C)			Germination (20°C, sable stérile, obscurité, 28 jours)				
	N 0	N I	N II	N III	N IV	N V	N VI	N VII
	0 jour (T)	1 jour (I1j)	2 jours (I2j)	7 jours (G7j)	10 jours (G10j)	16 jours (G16j)	21 jours (G21j)	28 jours (G28j)
5MC	100% <u>I</u>	84% <u>I</u> 16% RP	40% <u>I</u> 60% <u>RP</u>	17% I 69% <u>FRP</u> 15% G<5	8% I 43% FRP 49% <u>G&lt;5</u>	4% I 60% G<5 36% <u>G&gt;5</u>	4% I 15% G<5 58% G>5 23% E	4% I 9% G<5 16% G>5 71% <u>E</u>
	100% <u>I</u>	74% <u>I</u> 26% RP	57% <u>I</u> 43% <u>RP</u>	57% <u>I</u> 34% RP 11% G<5	25% I 47% <u>RP</u> 28% G<5	17% I 23% RP 33% <u>G&lt;5</u> 9% G>5 18% C	13% I 22% RP 23% G<5 13% G>5 29% C	12% I 22% RP 24% <u>G&gt;5</u> 38% C 4% E

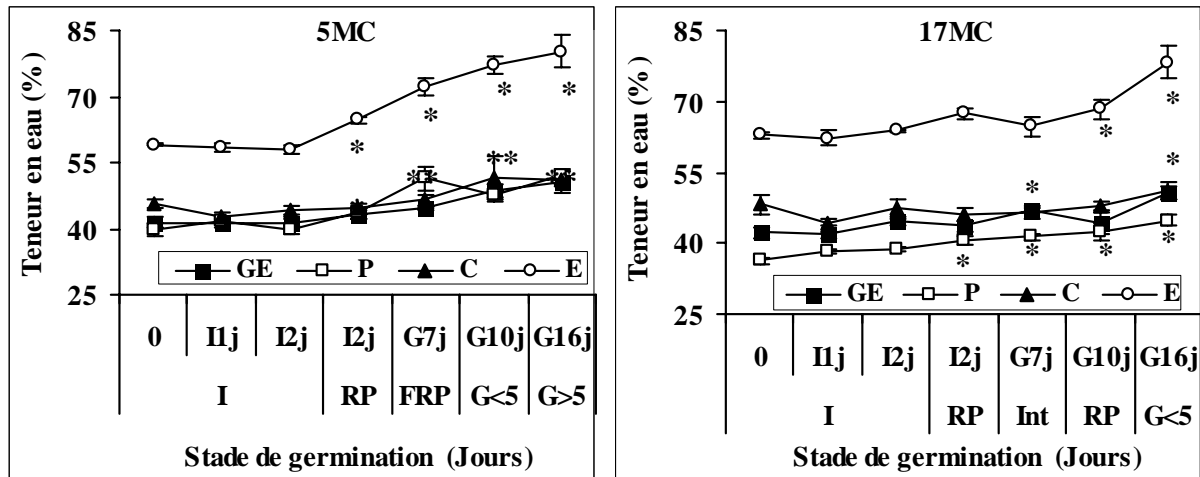


Figure 2. Evolution de la teneur en eau des glands entiers (GE), du péricarpe (P), des cotylédons (C) et de l'embryon (E) durant la germination des glands conservés durant 5 mois (5MC) et 17 mois (17MC) au froid (0°C) humide.

## Conclusion

La conservation à long terme des glands, une alternative au succès de la reforestation des subéraies, est compromise par le développement des champignons après 17 mois de conservation au froid (0°C) humide dans des sacs de polyéthylène (30 µm d'épaisseur). La prolongation de la durée de conservation des glands dépend de la résolution de ce problème pathogénique complexe (endogène).

## Remerciements

Nous remercions toutes les parties (FAIR5 CT97-3480; CREOAK, QLRT-2001-01594; FCT) qui ont participé aux financements de ce travail. Nous tenons à remercier vivement la Station Forestière Nationale (EFN, Oeiras) avec une mention particulière pour le Laboratoire d'Analyses des Semences qui ont collaboré avec leurs infrastructures.

## Références

- ASMRFC, Actes du Séminaire Méditerranéen sur la Régénération des Forêts de Chêne Liège, 1998 : Tabarka 22-24 Octobre 1996, Annales de l'INRGREF, N° spécial, 259 p.
- Aussenac, G., Guehl, J.M., Kaushal, P. Granier, A. & Grieu, Ph. 1988: Critères physiologiques pour l'évaluation de la qualité des plants forestiers avant plantation. – Rev. For. Fr. 40: 131-139.
- Bonnet-Masimbert, M. & Muller, C. 1993: Storage of acorns: limits and recent breakthroughs. – In: Anonymus: Internationales Symposium uber Forstsaatgut. 8-11 June 1993 Münster, Uelzen Proceeding: 119-130.
- Branco, M.; Branco, C., Merouani, H. & Almeida, M.H. 2002: Germination success, survival and seedling vigour of *Quercus suber* acorns in relation to insect damage. – For. Ecol. Manag. 166: 159-164.

- Cabral, M.T., Lopes, F. & Sardinha, R.A. 1993: Determinação das causas de morte do sobreiro de Santiago do Cacém, Grândola e Sines. Relatório de síntese. – *Silva lusit.* 1(1): 7-24.
- Crawley, M.J. & Long, C.R. 1995: Alternate bearing, predator satiation and seedling recruitment in *Quercus robur* L. – *J. Ecol.* 83: 683-696.
- Delatour, C. & Morelet, M. 1979: La pourriture noire des glands. – *Rev. For. Fr.* 31 : 101-115.
- Delatour, C. 1977: Recherche d'une méthode de lutte curative contre le *Ciboria batschiana* (Zopf) Buchwald chez les glands. – *Eur. J. For. Pathol.* 8 : 193-200.
- Delatour, C., Muller, C. & Bonnet-Masimbert, M. 1982: Progress in acorn treatment in a long term storage prospect. – In: IUFRO Working party on seed problems. Proceedings of the international symposium on forest tree storage, Septembre 23-27, 1980, ed Wang and Pitel, Petawa National Forest Institute. Canadian Forest Service: 126-133.
- Diáz-Fernandez, P.M & Gil Sanchez, L. 1998: La régénération naturelle dans les peuplements marginaux de chêne-liège. – In : Actes du séminaire méditerranéen sur la régénération des forêts de chêne-liège, Tabarka 22-24 Octobre 1996. Ann. INRGREF, N° spécial : 22-34.
- Fuchs, M.A., Krannitz, P.G. & Harestad, A.S. 2000: Factors affecting emergence and first-year survival of seedlings of Garry oaks (*Quercus garryana*) in British Columbia. – *Can. For. Ecol. Manage.* 137: 209-219.
- Girard S., Clément, C., Boulet-Gercourt, B. & Guehl J.M. 1997: Effects of exposure to air on planting stress in red oak seedlings. – *Ann. Sci. For.* 54: 395-401.
- Guthke, J. & Spethmann W., 1993: Physiological and pathological aspects of long-term storage of acorns. – *Ann. Sci. For.* 50 (suppl. 1): 384-387.
- Hasnaoui, B. 1998 : Régénération naturelle du chêne-liège: difficultés et proposition de solutions. – In : Actes du séminaire méditerranéen sur la régénération des forêts de chêne-liège, Tabarka 22-24 Octobre 1996, Ann. INRGREF, N° spécial : 126-147.
- Herrera, J. 1995 : Acorn predation and seedling production in a low-density population of cork oak (*Quercus suber* L.). – *For. Ecol. Manage.* 76: 197-201.
- ISTA, International Rules for Seed Testing 1985: Determination of moisture content. – *Seed Sci. Techn.* 13: 338-341.
- ISTA, International Rules for Seed Testing 2003: Biochemical test for viability. The topographical tetrazolium test. Annexe to Chapter 6: Tetrazolium Test 6A-1.
- Lorimer, C.G., Chapman, J.W. & Lambert, W.D. 1994: Tall understorey vegetation as a factor in the poor development of oak seedlings beneath mature stands. – *J. Ecol.* 8: 227-237.
- Louro, G. 1999: Avaliação da aplicação de programas de apoio à floresta na região do algarve. – Direcção Geral das Florestas (DGF-Lisboa), Portugal, 29 p.
- Merouani, H., Apolinário, L.M., Almeida, M.H. & Pereira, J.S. 2003: Maturation and acquisition of desiccation tolerance in acorns of cork oak (*Quercus suber* L.). – *Seed Sci. Techn.* 31: 111-124.
- Merouani, H., Branco, M., Almeida, M.H. & Pereira, J.S. 2001a: Comportement physiologique des glands de chêne-liège (*Quercus suber* L.) durant leur conservation et variabilité inter-individus producteurs. – *Ann. For. Sci.* 58: 143-153.
- Merouani, H., Branco, M., Almeida, M.H. & Pereira, J.S. 2001b: Effects of acorn storage duration and parental tree on emergence and physiological status of cork oak (*Quercus suber* L.) seedlings. – *Ann. For. Sci.* 58: 543-554.

- Merouani, H., Branco, M., Almeida, M.H. & Pereira, J.S. 2001c: Management and long-term storage of cork-oak acorns. – In : A practical handbook, Priod, Monteleone & Belletti, DIVAPRA, University of Turing, Italy: 23 p.
- Messaoudène, M., Metna, B. & Djouaher N. 1998: La régénération naturelle de *Quercus suber* L. dans la forêt domaniale des Beni-Ghobri (Algérie). – In : Actes du séminaire méditerranéen sur la régénération des forêts de chêne-Liège, Tabarka 22-24 Octobre 1996, Ann. INRGREF, N° spécial: 73-86.
- Messaoudene, M.1984 : Résultats des essais de semi-directs du chêne liège à Melata. – Rapport interne. Institut National de Recherche Forestière (INRF-Algérie): 10.
- O'Reilly, C., McCarthy, N., Keane, M., Harper, C.P. & Gardiner, J.J. 1999: The physiological status of Douglas fir seedlings and the field performance of freshly lifted and cold stored stock. – Ann. For. Sci. 56: 391-402.
- Schröder, T. 2002: On the geographic variation of *Ciboria batschiana* (Zopf) Buchwald, the main pathogenic fungus on acorns of *Quercus robur* and *Q. petraea* in Europe. – Dendrobiol. 47 (suppl.): 13-19.
- Schröder, T., Kehr, R., Procházkova, Z. & Sutherland, J.R. 2004: Practical methods for estimating the infection rate of *Quercus robur* acorn seedlots by *Ciboria batschiana*. – For. Path. 34: 187-196.
- Sondergaard, P. 1991: Essais de semis du chêne-liège *Quercus suber* L. dans la forêt de Bab-Azhar, une subéraie de montagne au Maroc. – Ann. Rech. Forest. Maroc 25:16-29.
- Sork, V.L. & Bramble, J.E. 1993: Prediction of acorn crops in three species of North American oaks: *Quercus alba*, *Q. rubra* and *Q. velutina*. – Ann. For. Sc. 50 (suppl. 1): 128-136.
- Tinus, R.W. 1996: Root growth potential as an indicator of drought stress history. – Tree Physiol. 16: 795-799.

### **Fungus development, a factor limiting the long-term storage of cork oak acorns**

**Abstract:** With agreement between the Forest Research Center (ISA, Portugal) and the University of Alicante, a study was performed to test the germination of *Quercus suber* acorns treated by thermotherapy before being stored during 5 (5MC) or 17 months (17MC) at 0 °C and 85% of relative humidity. Morphological and physiological analyses were made at 8 different levels during the germination process, level 0 (control) corresponding to the moment at which acorns were kipped from the storage chamber. Results showed a significant development of fungi on 17MC-acorns, which led to a significant reduction in germination. Indeed, after the 16 day germination, 18% of the 17MC-acorns presented myceliums, although 42% were already germinated. At the test end (28<sup>th</sup> day), the fungal attack reached the critical values of 40%. The fungi attack was localized on the acorns and did not depend on medium contamination. The increase of embryo moisture content and Tetrazolium test demonstrated that 75% of 17MC acorns were viable. No fungi development was observed on 5MC acorns. Germination of 5M-acorns was significantly faster and uniform; at 16<sup>th</sup> day testing, germination reached 96%. At the end of the test, 71% of 5MC-acorns showed an epicotyl emergence. Comparisons with previous results concluded thermotherapy inefficiency after more than 12 months storage.

**Key words:** acorn storage, germination, seedling emergence, fungi, *Quercus suber*

## **Efeito da idade e da fertilização na qualidade das plantas do sobreiro (*Quercus suber* L.) em viveiro.**

*Hachemi Merouani, Filipe Costa e Silva, Teresa Sampaio, Maria João Lourenço, Carla Faria, João Santos Pereira, Maria Helena Almeida.*

<sup>1</sup> Instituto Superior de Agronomia, Centro de Estudos Florestais, Tapada da Ajuda 1349-017 Lisboa, Tel: 213653384, Fax: 213645000. E-mail: hmerouani@isa.utl.pt

**Resumo:** A plantação tem sido uma técnica muito utilizada em projectos de reflorestação do montado de sobreiro, uma vez que a sementeira é limitada temporalmente pelo facto de não se dominar a conservação a longo prazo das glandes (sementes recalcitrantes). Consequentemente, a produção das plantas provém exclusivamente de sementes frescas (Novembro - Janeiro) condicionando a sua idade no momento da plantação (10-14 meses). A idade da planta influencia o seu potencial de crescimento após a plantação, estando regulamentada por legislação (*Decreto-Lei n.º 205/2000, de 12 de Setembro*). A aplicação de fertilizantes tem sido sugerida como uma técnica de produção em viveiro destinada a melhorar a qualidade da planta. No âmbito de diversos projectos (*CREOAK-QLK5-CT-2002-01594; POCTI/41359/AGG/2001*), temos vindo a aprofundar o conhecimento sobre a qualidade das plantas do sobreiro.

Produziram-se em viveiro, plantas de idade diferente provenientes de sementes frescas e conservadas (3 e 6 meses), obtendo-se respectivamente plantas de 9, 7 e 5 meses. Nas plantas de 7 meses, foi aplicado um tratamento de fertilização (50 ml da solução NPK, 12-2-12) e de micorrização (*Pisolithus tinctorius*).

Foram avaliados diferentes parâmetros morfológicos e fisiológicos durante a fase de crescimento da planta em viveiro, assim como o potencial de crescimento das raízes no momento de plantação. Os resultados apresentados centram-se no efeito de ambos os factores (idade à plantação e fertilização) na qualidade das plantas.

Palavras-chaves: *Qualidade, Material Florestal de Reprodução, Conservação de glandes, idade da planta, Q. suber*

### **Introdução**

O montado de sobreiro é considerado um património florestal Mediterrâneo dado o papel que desempenha em termos ambientais e sócio-económicos. Em Portugal, estes ecossistemas florestais têm vindo a ser reabilitados, contrariando a tendência para a regressão e aumentando a sua área. O insucesso da sementeira, avaliado através da elevada mortalidade e dos danos causados por animais, tem sido um dos factores a promover o recurso à plantação como técnica de reflorestação (Carvalho e Morais 1996; Louro 1999), mas também pelo facto de ser limitada temporalmente devido a não se dominar a conservação das glandes (sementes recalcitrantes). Em França, a produção de plantas de sobreiro usando sementes conservadas representou apenas 10 a 15% do total produzido em viveiro entre 1974 e 1989 (Bastien 1992). O autor explica esta redução pela indisponibilidade das glandes ao longo do ano e pelo seu elevado preço devido à sua alta qualidade. Em Portugal, a qualidade das sementes conservadas tem vindo a ser reconhecida (Teixeira 2003). Entre 1997 e 2002 o CENACEF processou cerca de 38 toneladas de glande, das quais resultaram 30 toneladas de glandes limpas, representando apenas 8% das necessidades do mercado (Silva e Ribeiro, 2003). Esta mesma instituição certificou 155 toneladas de glande a partir de 2001.

As plantações com espécies de crescimento lento (ex. *Quercus*) têm, geralmente, um maior insucesso do que as de crescimento rápido (e.g. *Pinus*, *Eucalyptus*) (Broncano *et al.* 1998). Este facto pode ser atribuído a diversos factores: i)- técnica de produção e manipulação de plantas no viveiro, ii)- técnica de instalação e iii)- condições biológicas (predadores) e ambientais do local da instalação (Fuchs 2000, Pardos e Montero 2000, Kiriinya 2001). Através de alguns cuidados culturais antes da plantação (e.g. tratamentos fitossanitários) e após a plantação (e.g. rega) (Rey-Benayas 1998) é possível melhorar significativamente a sobrevivência. No entanto, a qualidade do Material Florestal de Reprodução (MFR) à plantação é considerado o ponto de partida do sucesso das instalações de campo (Tinus 1996; McKay *et al.* 1999; O'Reilly *et al.* 1999, Villar-Salvador *et al.* 2004).

Ao longo do tempo a qualidade das plantas foi investigada de forma a encontrar parâmetros que permitissem prever o crescimento das plantas e a sua sobrevivência no campo. Ritchie (1984) distingue duas categorias de parâmetros: 1. Parâmetros morfológicos, hídricos, nutricionais da planta e 2. Parâmetros fisiológicos que avaliam a taxa de crescimento e a tolerância aos diversos stress ambientais. Alguns destes parâmetros (e.g. *razão parte aérea/parte radicular - S/R*, potencial de crescimento das raízes - *RGP*, reservas) mostraram estar bem correlacionados com o sucesso da plantação (Tinus 1996, Villar-Salvador *et al.* 2004). Recentemente, os mais importantes parâmetros de qualidade da planta abrangem o conceito da taxa de crescimento relativo (TCR) (Hunt *et al.* 2002, Villar *et al.* 2004).

Algumas práticas culturais de viveiro, como a fertilização e a micorrização, têm vindo a ser aplicadas nas últimas décadas para melhorar a qualidade da planta e aumentar o seu potencial de sucesso no campo. A fertilização pode levar a uma significativa melhoria da taxa de crescimento em plantas de diversas espécies (Fan *et al.* 2004, Villar-Salvador *et al.* 2004) e tem sido aplicada recentemente no género *Quercus* (Welander e Ottosson 2000, Villar-Salvador *et al.* 2004). Contudo, uma fertilização em excesso pode prejudicar o sucesso da plantação, induzindo a redução do crescimento radicular e da tolerância à secura (Tan and Hogan 1995) e o aumento da área foliar, do tamanho do caule e do S/R (Pardos e Montero 2000). Ao contrário, Villar-Salvador *et al.* (2004) mostrou que uma forte fertilização (145mg N, 16mg P e 34mg K/planta) em plantas de azinheira (*Q. ilex* L.) em viveiro pode melhorar o crescimento e a sobrevivência durante os dois primeiros anos após a instalação.

Os estudos de micorrização centram-se na selecção das espécies de fungos, no seu isolamento e na sua forma de aplicação em viveiro ou no campo (González-Ochoa *et al.* 2003). A micorrização, utilizada especialmente no género *Pinus* e *Eucalyptus*, mostrou exercer influência na absorção dos nutrientes e nas relações hídricas da planta (Colpaert *et al.* 1996). Em *Quercus ilex* inoculadas por *Tuber melanosporum*, Nardini *et al.* (2000) demonstraram que a assimilação líquida e a condutância hidráulica são significativamente favorecidas.

Para além dos tratamentos culturais e da manipulação das plantas durante a fase de produção, também a idade das plantas nas condições do viveiro pode constituir um factor determinante da qualidade das plantas, condicionando o seu futuro crescimento. Em 5 espécies (4 de *Eucalyptus* e 1 de *Acacia*), Kiriinya (2001) verificou que o tempo de 5-6 meses de permanência no viveiro exerce um efeito positivo na TCR e na sobrevivência da planta durante os seus estados juvenis. Tais estudos são difíceis com as espécies recalcitrantes, devido à dificuldade de conservação das glandes. Consequentemente, a produção de plantas de muitas espécies do género *Quercus* em geral e de sobreiro em particular, provêm exclusivamente de glandes frescas (Novembro – Janeiro) condicionando a sua idade no momento da plantação a 9-14 meses. Até ao presente não houve ainda um estudo aprofundado sobre o efeito da idade no crescimento e na sobrevivência do sobreiro, apesar de esta estar regulamentada por legislação (*Portaria n.º 918/98, de 21 de Outubro*). Em trabalhos anteriores integrados em diferentes Projectos (*FAIR5CT97 3480; CREOAK-QLK5-CT-2002-01594; POCTI/41359/AGG/2001*), verificou-se que a conservação melhora a qualidade dos MFR (glandes e plântulas). De facto, em condições controladas, as plantas produzidas de sementes conservadas mostram uma significativa melhoria da emergência, uniformidade e do crescimento relativamente às plantas produzidas de sementes frescas (Merouani *et al.* 2

2001a', b), o que significa uma positiva alteração fisiológica nas sementes conservadas. No processo de 24 meses de conservação é possível distinguir 6 principais níveis a que correspondem estados morfológicos, fisiológicos (Merouani *et al.* 2001a, b, 2004) e bioquímicos diferentes (não publicados).

O objectivo principal deste estudo é analisar o efeito da idade na qualidade de plantas de sobreiro, produzidas em viveiro a partir de glandes com diferentes tempos de conservação, através da medição da TCR à plantação e usando um tratamento fertilizado e micorrizado como referência de melhor crescimento. Especificamente, iremos comparar os parâmetros morfológicos, fisiológicos e bioquímicos que melhor avaliam a qualidade da planta no momento de plantação. Futuramente, estes parâmetros serão correlacionados com a sobrevivência e crescimento das plantas instaladas no campo (*Plantação em Novembro – Dezembro 2004, Concelho de Coruche*).

## **Material e métodos**

### *Recolha e conservação das sementes*

Um lote (400 kg) de glandes recentemente caídas (num intervalo de 5-7 dias) foi recolhido na Herdade da Palma (Alcácer do Sal) e conservado em frio húmido. A técnica de manipulação e de conservação das glandes encontra-se descrita em Merouani *et al.* (2001c).

### *Avaliação da qualidade das sementes*

Neste estudo, consideraram-se 3 lotes de glande em níveis fisiológicos diferentes: glandes frescas (F); glandes com 3 meses de conservação (3MC) e glandes com 6 meses de conservação (6MC). A qualidade morfológica (aspecto externo, humidade) e fisiológica (Capacidade germinativa (%G), ISTA 2003; Tempo médio de germinação (TMG) e uniformidade ( $T_{75-25}$ ) foi analisada para cada nível. O TMG e a  $T_{75-25}$  foram determinados pelo Software *SeedCalculator* (CPRO, Holanda) de acordo com o descrito em Merouani *et al.* 2001a. A concentração de amido foi determinada nos cotilédones e no embrião usando o método da antrona (Halhoul e Kleinberg, 1972).

### *Pré-germinação e produção de plantas*

No viveiro florestal do ISA foram produzidos: 760 sobreiros provenientes de sementes frescas (F) semeados a 19 de Dezembro de 2003; 2000 sobreiros provenientes de sementes conservadas 3 meses (P-3MC) semeados a 19 de Fevereiro de 2004; 760 sobreiros provenientes de sementes conservadas 6 meses (P-6MC) semeados a 17 de Maio de 2004. O efeito da idade da planta foi avaliado nos 3 lotes de plantas e foi também avaliado o efeito da fertilização e micorrização nos sobreiros pertencentes ao lote P-3MC. As técnicas da inoculação e de fertilização recomendadas pelo laboratório do INRA, condicionaram a idade das plantas o que obrigou à utilização do nível 3MC da semente.

Para confirmar a viabilidade das glandes, foi efectuada uma pré-germinação. Assim, quando o pericarpo rompeu ou a radícula emergiu (1-10 mm) as glandes foram escolhidas individualmente e colocadas cuidadosamente nos contentores de 300 cm<sup>3</sup> (Ref. 40 Pinextra 3155, CETAP, Portugal). O substrato utilizado foi uma mistura de turfa com granulado de cortiça (2-8mm de diâmetro), numa proporção de 7:3, com pH entre 5.7 e 6.3. Os contentores foram colocados numa área coberta com uma rede de ensombramento (48 ±0.05% (Radiometer, LI-170), situada a 2 metros de altura acima dos contentores. Devido à perda de sementes por predadores (gaio, melro), os contentores foram ainda cobertos por uma rede de malha fina, até que a maioria das plantas atingisse uma altura entre os 4 e 6 cm.

### *Práticas de viveiro (Micorrização e Fertilização das plantas)*

Após 3 meses de crescimento, em Junho de 2004, 800 plantas (P-3MC) foram inoculadas com 60 ml de um inóculo sólido de *Pisolithus tinctorius* (P) (constituído por turfa, vermiculite e granulado de cortiça, numa proporção de 2:4:3). Manualmente adicionou-se o volume referido ao substrato de origem de cada planta. O micélio utilizado, neste estudo, foi colhido em Dria (Maamora, Marrocos) num povoamento de<sub>3</sub>

sobreiro de 6 anos de idade e isolado em Novembro – Dezembro de 2001. Nas restantes plantas foi adicionada a mistura já referenciada, sem inóculo do fungo.

Seis semanas após a inoculação, procedeu-se à fertilização das plantas inoculadas e não inoculadas (P-3MC) identificadas por (P7M-3MC\_FP) e (P7M-3MC\_F), respectivamente. Foi considerado como controle (C), um lote de plantas, não inoculadas e sem fertilização. A solução de fertilização (NPK, 12-2-12) diluída a 0.25% foi aplicada semanalmente, durante 6 semanas, automaticamente (50 ±7.4 ml por planta).

#### *Parâmetros de qualidade da planta*

A partir da data de sementeira foi registada semanalmente, a emergência das plantas e posteriormente foi determinada a emergência máxima (E) e o tempo de emergência (TE) das plantas de todos os lotes (P-F, P-3MC, e P-6MC). A idade “0” de cada um destes lotes foi definida pelo momento em que se verificou 50% de emergência. A idade dos sobreiros à plantação foi de 9, 7 e 5 meses, consoante pertenciam a plantas provenientes de sementes frescas, conservadas 3 ou 6 meses e foram identificadas por P9M-F, P7M-3MC e P5M-6MC, respectivamente.

A qualidade das plantas foi caracterizada em todos os tratamentos no momento da plantação (Novembro de 2004). A altura e o diâmetro do colo foram medidos em todos os tratamentos P9M-F, (N= 669), P5M-6MC, (N= 694) e P7M-3MC\_C, \_F e \_FP (N= 80 cada um). Para os tratamentos P9M-F e P5M-6MC, a altura foi também medida ao 1º mês de idade.

A uniformidade da altura das plantas foi estimada pela repartição em 3 classes: < a 13, [13-24] e > 24 cm. O limite superior (24 cm), correspondeu à média das alturas de todas as plantas dos diferentes tratamentos (N = 1613 plantas) e o limite inferior, 13 cm, ao limite mínimo admitido para comercialização (*Decreto-Lei nº 205/2000, de 12 de Setembro*).

No momento de saída das plantas do viveiro para a plantação, amostraram-se 45 plantas por tratamento, dentro de 5 classes de altura ( $M-2*Stdev$ ,  $M-1*Stdev$ , Media,  $M+1*Stdev$ ,  $M+2*Stdev$ ). Cada um destes conjuntos foi separado em 3 grupos equitativos de 15 plantas, mantendo-se a representatividade do tratamento, nos quais foram avaliados as reservas (amido e açúcares totais do pivot e eixo), o potencial de crescimento das raízes (RGP) e a partição da biomassa.

A taxa de crescimento relativo (TCR) definido pelo incremento da biomassa por unidade de biomassa e tempo foi avaliada com base no modelo:  $TCR = (\ln P_2 - \ln P_1) / (t_2 - t_1)$  (Hunt *et al.* 2002, Villar *et al.* 2004). A TCR referente ao período de produção em viveiro foi avaliada entre o 1º mês de idade e a plantação nos tratamentos P9M-F e P5M-6MC e num período de 23 dias para todos os tratamentos em condições controladas (20°C, 12h/12h, dia/noite). Foi calculada a razão entre a biomassa das raízes novas secundárias e a biomassa total da planta, e ainda relativamente às suas componentes. A análise das raízes e a área foliar foram determinados com o Software WinRHIZO 2003b.

#### *Tratamento dos dados*

O delineamento experimental utilizado considerou dois factores em estudo: idade da planta e práticas culturais aplicadas em plantas provenientes de sementes conservadas 3 meses. O efeito destes factores nas variáveis das plantas foi avaliado separadamente através da análise da variância (ANOVA) a um factor. O teste de Tukey, permitiu a comparação entre as médias dos tratamentos para  $\alpha=5\%$ . Sempre que os pressupostos de distribuição normal e de homogeneidade da variância para a variável em causa não foram satisfeitos, mesmo após transformação dos dados, utilizou-se o teste Kruskal-Wallis. Aplicou-se um teste *de t* para comparar os parâmetros de qualidade das plantas provenientes de sementes conservadas durante 6 meses (P5M-6MC) e as produzidas de sementes conservadas durante 3 meses mas fertilizadas (P7M-3MC\_F).

## **Resultados**

### Qualidade das glandes

A tabela 1 mostra os parâmetros de qualidade dos diferentes níveis de glandes (F, 3MC e 6MC) utilizados na produção dos lotes de plantas. O tempo médio de germinação (TMG), a uniformidade ( $T_{75-25}$ ) e a concentração de amido nos cotilédones foram aqueles parâmetros que apresentaram uma alteração significativa durante a conservação. O TMG passou de 14.9 dias nas glandes do nível F para 5.4 e 3.8 dias nas conservadas (níveis 3MC e 6MC, respectivamente). A germinação das glandes conservadas foi mais uniforme do que a das frescas. A concentração de amido cotilédonar [AmC] aumentou significativamente cerca de 12% do nível F (648 mg g<sup>-1</sup>) para o 3MC (738.3 mg g<sup>-1</sup>), tendo-se reduzido esta concentração no tratamento 6MC para um valor próximo ao do F (Tabela 1).

Embora não tenha havido diferenças significativas na concentração de amido do embrião [AmE], observou-se uma diminuição de 12% entre o nível F e 3MC e de 9% entre 3MC e 6MC. Não se verificaram efeitos da conservação sobre a humidade das glandes e das suas componentes (pericarpo, cotilédones), nem sobre a germinação final (%G) (Tabela 1).

**Tabela 1.** Parâmetros de qualidade dos diferentes níveis de sementes (frescas: -F, e conservadas durante 3 meses: -3MC e 6 meses: -6MC) utilizadas na produção de plantas dos diferentes tratamentos. Valores são médias  $\pm$  Erro padrão. As diferentes letras indicam diferenças significativas ( $P \leq 0.05$ ) entre os níveis. %G = % final de germinação obtido em 28 dias. 20-23°C. escuro. área esterilizada.

		Níveis de sementes			
		F	3MC	6MC	P
Humidade (%)	1- Glante inteira	40.1 $\pm$ 0.6 a	40.7 $\pm$ 0.4 a	41.5 $\pm$ 1.1 a	=0.434
	2- Pericarpo	38.8 $\pm$ 1.1 a	39.6 $\pm$ 0.6 a	37.5 $\pm$ 1.0 a	=0.536
	3- Cotilédones	41.2 $\pm$ 1.1 a	43.2 $\pm$ 1.2 a	44.8 $\pm$ 1.6 a	=0.230
Comportamento germinativo	4- %G	90.0 $\pm$ 2.9 a	96.3 $\pm$ 1.3 a	93.8 $\pm$ 2.4 a	=0.205
	5- TMG (dias)	14.9 $\pm$ 0.6 a	5.4 $\pm$ 0.2 b	3.8 $\pm$ 0.4 c	<0.001
	6- $T_{75-25}$ (dias)	5.5 $\pm$ 0.7 a	1.4 $\pm$ 0.2 b	2.1 $\pm$ 0.4 b	<0.001
Amido [mg.g <sup>-1</sup> , PS]	7- Cotilédones	648.3 $\pm$ 22.0 b	738.3 $\pm$ 22.1 a	649.3 $\pm$ 6.9 b	=0.021
	8- Embrião	355.7 $\pm$ 36.7 a	313.5 $\pm$ 7.8 a	286.3 $\pm$ 24.1 a	=0.237

### Qualidade das plantas

Foram considerados separadamente os parâmetros que avaliam: i)- a relação planta / glante, ii)- a morfologia e a fisiologia.

#### Parâmetros da relação planta / glante

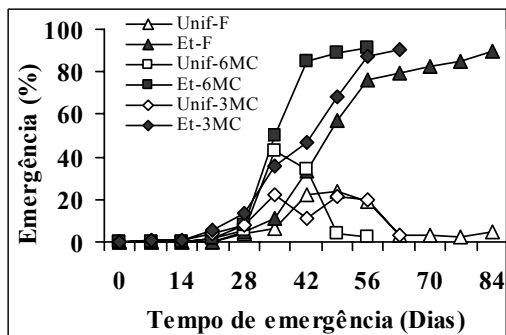
Embora a emergência total das plantas ( $E_t = 90.5 \pm 0.5\%$ ) não tenha dependido dos níveis das glandes (F, 3MC e 6MC), o tempo da emergência total ( $TE_t$ ) e o de emergência de 50% ( $TE_{50}$ ), foram drasticamente afectados por estes diferentes níveis (Figura 1). O  $TE_t$  foi de 84, 63 e 56 dias para os lotes de plantas P-F, P-3MC e P-6MC, respectivamente, e o  $TE_{50}$  das plantas dos mesmos lotes foi obtido nos períodos de [42-56], [35-49] e [35-42] dias. Uma correlação positiva foi obtida entre a média do tempo de emergência de 50% das plantas ( $mTE_{50}$ ) de cada lote com alguns parâmetros dos níveis de glandes ([AmE]:  $R^2 = 0.99$ , TMG:  $R^2 = 0.96$  e  $T_{75-25}$ :  $R^2 = 0.77$ ) (Figura 2). As plantas do lote P-3MC, apresentaram dois momentos de maior emergência ( $\approx 22\%$ ), um aos 35 dias e outro entre os 49-56 dias após a sementeira (Figura 1).

#### Parâmetros morfológicos

As práticas de viveiro induziram um crescimento significativo ( $P < 0.001$ ) da parte aérea da planta (altura e diâmetro do colo) (Figura 3). A altura média (33 cm) das plantas fertilizadas (F) e micorrizadas (FP) foi o dobro dos restantes tratamentos (16.4-18.5 cm). Contudo, houve um diferente efeito no diâmetro com as plantas inoculadas a apresentar um diâmetro significativamente mais pequeno do que as fertilizadas,<sub>5</sub>

mas similar ao diâmetro das plantas jovens (P5M-6MC).

A altura das plantas (P7M-3MC e P5M-6MC) produzidas dos 2 níveis de glandes conservadas foi significativamente ( $P < 0.001$ ) mais elevada (média de 19 cm) do que a das produzidas de glandes frescas (P9M-F, 16.4 cm) (Figura 3). No primeiro mês de crescimento, 81% das plantas P5M-6MC atingiram esta altura contra apenas 33% das P9M-F (Figura 3).

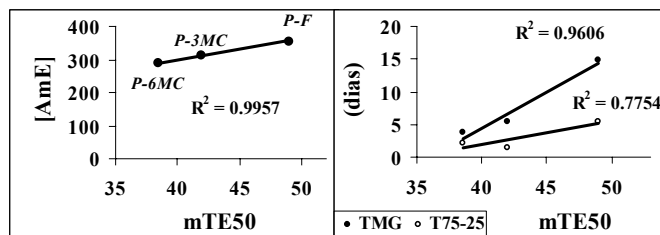


**Figura 1.** Emergência total ( $E_t$ , símbolos fechados) e uniformidade da emergência (Unif, símbolos abertos) das plantas dos diferentes lotes (1, 2 e 3) produzidos em viveiro de diferentes níveis de sementes (-F, 3MC e -6MC)

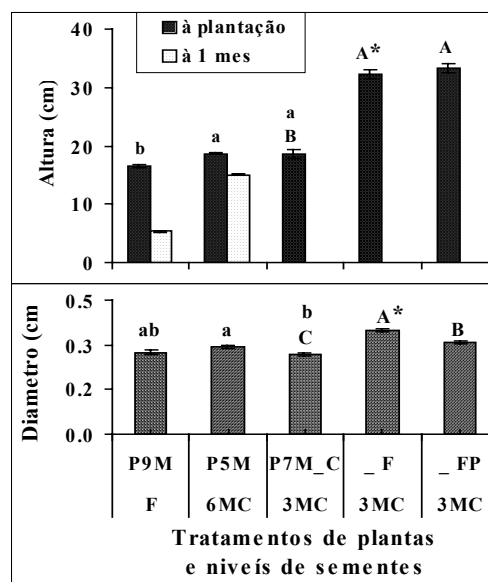
**Figura 3.** Efeito da idade e de práticas de viveiro (Fertilização "F" e Fertilizadas e micorrizadas "FP") na altura e no diâmetro do colo dos diferentes tratamentos. Valores são médias  $\pm$  Erro padrão. As diferentes letras indicam diferenças significativas ( $P \leq 0.05$ ) entre os tratamentos (minúsculas para o factor idade e maiúsculas para o factor práticas); \*: Diferenças significativas (t-test) entre P5M-6MC e P7M-3MC-F.

O tratamento P5M-6MC apresentou uma melhor uniformidade que todos os outros com 71.2% das plantas dentro da classe de alturas entre 13 e 24 cm, seguido dos tratamentos não fertilizados (P7M-3M\_C, 62% e P9M-F, 60.6%). Para os tratamentos F e FP a maior uniformidade (77 e 70%, respectivamente) situou-se na classe superior ( $> 24$ cm) com uma média de altura de  $36 \pm 7.3$  cm (Figura 4).

As plantas mais jovens apresentaram ainda uma razão de área foliar significativamente mais elevada do que as plantas mais velhas (Tabela 2). No entanto, o crescimento foliar do tratamento fertilizado e inoculado (P7M-3MC\_FP) foi significativamente mais elevado do que todos os outros, apresentando uma razão da área foliar (LAR) e uma fracção de massa foliar (LMF) de respectivamente,  $29.2 \text{ cm}^2 \text{ g}^{-1}$  e de  $0.27 \text{ g g}^{-1}$ , não ultrapassando os  $21 \text{ cm}^2 \text{ g}^{-1}$  e  $0.21 \text{ g g}^{-1}$ , respectivamente, para o resto dos tratamentos (Tabela 2). Quer para o factor idade quer para as práticas culturais não se observaram diferenças significativas entre a área específica das folhas (SLA) dos tratamentos.



**Figura 2.** Correlação entre a média do tempo da emergência dos 50% das plantas (mTE50) e a concentração de amido do embrião [AmE] e o tempo médio da germinação (TMG) da glandes e a sua uniformidade ( $T_{75-25}$ ).





**Figura 4.** Percentagem de plantas (%) dos diferentes tratamentos produzidas dos diferentes níveis de glandes por classes de altura. *N*: numero de plantas por tratamento

Classes Alturas	P9M F	P5M 6MC	P7M 3MC	P7M 3MC	P7M 3MC
< 13]	28.5	13.5	21.5	1.9	15.1
[13-24]	60.6	71.2	62.0	20.9	15.1
> 24]	10.8	15.1	16.5	77.2	69.9
<i>N</i>	592	624	79	158	186

**Tabela 2.** Efeito da idade e de práticas de viveiro (Fertilização "F" e Fertilizadas e micorrizadas "FP") nos parâmetros morfológicos dos diferentes tratamentos (*T*). Valores são médias  $\pm$  Erro padrão. As diferentes letras (minúsculas para o factor idade e maiúsculas para o factor práticas) indicam diferenças significativas ( $P \leq 0.05$ ) entre os tratamentos; \*: Diferenças significativas (*t*-test) entre P5M-6MC e P7M-3MC-F.

<i>N</i>	<i>T</i>	LAR	LMF	SLA
F	P9M	14.5 $\pm$ 0.08 b	0.15 $\pm$ 0.005 b	97.3 $\pm$ 2.7 a
6MC	P5M	21.6 $\pm$ 1.2 a	0.20 $\pm$ 0.01 a	101.0 $\pm$ 3.0 a
	P7M-C	16.1 $\pm$ 1.5 bB	0.16 $\pm$ 0.01 abB	100.1 $\pm$ 2.7 aA
3MC	_F	20.5 $\pm$ 1.5 B	0.21 $\pm$ 0.02 AB	103.8 $\pm$ 7.3 A
	_FP	29.2 $\pm$ 2.3 A	0.27 $\pm$ 0.02 A	108.4 $\pm$ 2.5 A

**LAR:** Razão da área foliar ( $\text{cm}^2 \text{g}^{-1}$ ): área foliar / biomassa total da planta; **LMF:** fracção da massa foliar ( $\text{g g}^{-1}$ ): biomassa das folhas / biomassa total da planta; **SLA:** área específica da folhas ( $\text{cm}^2 \text{g}^{-1}$ ): área foliar / biomassa folha.

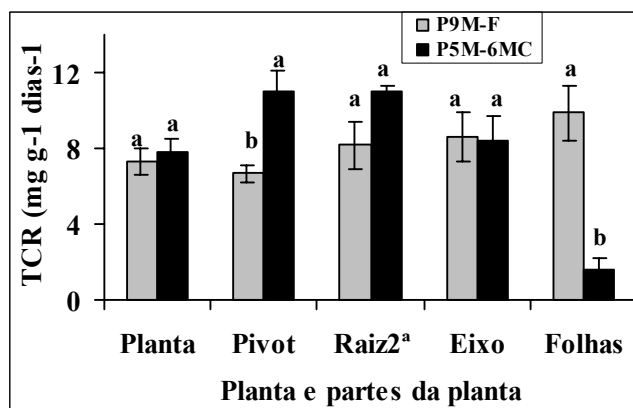
### Parâmetros fisiológicos

A Figura 5 mostra que apesar de não se terem encontrado diferenças significativas entre as taxas de crescimento relativo da planta inteira, do eixo dos 2 tratamentos (P5M-6MC e P9M-F) durante todo o período de produção (1 mês até a plantação), as plantas jovens investiram significativamente mais no crescimento do pivot ( $P = 0.020$ ) e sem diferenças significativas nas raízes secundárias. Pelo contrário as plantas mais velhas produziram significativamente mais folhas ( $P < 0.001$ ).

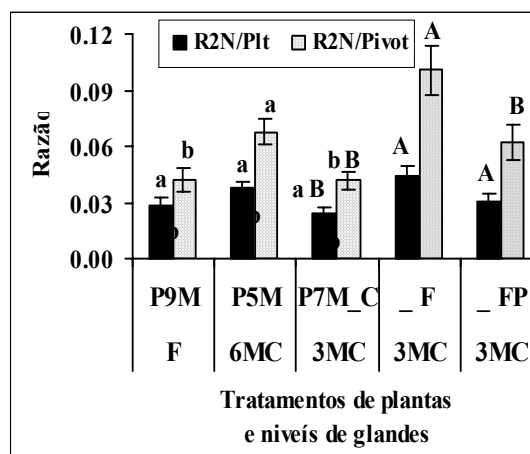
Verificou-se ainda em condições controladas (23 dias), não haver um efeito dos tratamentos sobre a TCR da planta e das suas componentes, contudo observou-se uma diferença significativa ( $P = 0.001$ ) quando se analisou separadamente a biomassa das novas raízes ( $R2^a N$ ) dos diferentes tratamentos. De facto, a razão de  $R2^a N$  sobre a biomassa total da planta e do pivot foi significativamente ( $P = 0.001$ ) mais alta nas plantas fertilizadas. De qualquer forma, não se encontraram diferenças da  $R2^a N$ /pivot entre as plantas fertilizadas e as mais jovens (Figura 6).

A tabela 3 mostra que a taxa de assimilação líquida (NAR) das plantas jovens (P5M-6MC) e das plantas fertilizadas (\_F e \_FP) foi significativamente reduzida comparativamente aos outros tratamentos (P9M-F e P7M-3MC). Por outro lado, a fracção da biomassa do eixo (SMF) aumentou significativamente nestes três tratamentos. Comparando o efeito dos 2 factores (idade e práticas) verifica-se que as plantas não fertilizadas investiram significativamente mais no desenvolvimento do sistema radicular (principalmente nas raízes secundárias) enquanto as práticas favoreceram a parte aérea. De facto, a razão entre estas duas componentes (S/R) é quase 3 vezes mais elevada nos tratamentos \_F e \_FP do que nos tratamentos\_7

(P9M-F e P7M-3MC). É de apontar também que as plantas mais jovens apresentam um S/R duas vezes superior ao das plantas mais velhas (Tabela 3).



**Figura 5.** Efeito da idade na taxa de crescimento relativo (TCR) da planta e das suas componentes para o período de crescimento de 9 e 5 meses (P9M-F e P5M-6MC) à plantação. Valores são médias  $\pm$  Erro padrão. As diferentes letras indicam diferenças significativas ( $P \leq 0.05$ ) entre os



**Figura 6.** Efeito da idade e de práticas de viveiro (Fertilização "F" e Fertilizadas e micorrizadas "FP") na razão da biomassa das raízes novas sobre a biomassa total da planta (R2N/Plt) e sobre a biomassa do pivot (R2N/Pivot). Valores são médias  $\pm$  Erro padrão. As diferentes letras indicam diferenças significativas entre os tratamentos (minúsculas para o factor idade e maiúsculas para o factor

**Tabela 3.** Efeito da idade e de práticas de viveiro (Fertilização "F" e Fertilizadas e micorrizadas "FP") nos parâmetros morfológicos dos diferentes tratamentos (T). Valores são médias  $\pm$  Erro padrão. As diferentes letras indicam diferenças significativas ( $P \leq 0.05$ ) entre os tratamentos (minúsculas para o factor idade e maiúsculas para o factor práticas); \*: Diferenças significativas (t-test) entre P5M-6MC e P7M-3MC-F.

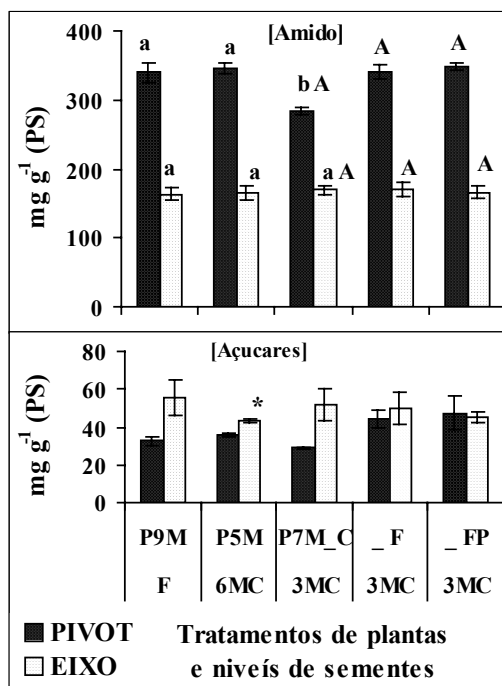
N	T	SMF	S/R	RMF	RMF- R2ª	RMF- Pivot	NAR
F	P9M	0.09 $\pm$ 0.004 b	0.32 $\pm$ 0.01 b	0.76 $\pm$ 0.01 a	0.10 $\pm$ 0.01 a	0.66 $\pm$ 0.01 a	0.07 $\pm$ 0.004 a
6MC	P5M	0.18 $\pm$ 0.01 a	0.62 $\pm$ 0.05 a	0.62 $\pm$ 0.02 b*	0.10 $\pm$ 0.01 a*	0.53 $\pm$ 0.01 b	0.05 $\pm$ 0.003 b
	P7M-C	0.09 $\pm$ 0.01 bB	0.35 $\pm$ 0.04 bB	0.75 $\pm$ 0.02 aA	0.09 $\pm$ 0.02 aA	0.65 $\pm$ 0.04 aA	0.06 $\pm$ 0.01 abA
3MC	-F	0.20 $\pm$ 0.02 A	0.71 $\pm$ 0.04 A	0.59 $\pm$ 0.01 A	0.09 $\pm$ 0.01 A	0.50 $\pm$ 0.01 B	0.05 $\pm$ 0.005 A
	-FP	0.17 $\pm$ 0.01 A	0.88 $\pm$ 0.2 A	0.56 $\pm$ 0.03 A	0.07 $\pm$ 0.01 A	0.49 $\pm$ 0.03 B	0.04 $\pm$ 0.002 B

**SMF:** fracção da biomassa do eixo ( $\text{g g}^{-1}$ ): biomassa do eixo / biomassa total da planta; **NAR:** Assimilação líquida ( $\text{g g}^{-1}$ ): taxa do incremento da biomassa da planta / unidade da área foliar; **RMF – pivot** ou **- R2ª:** fracção da biomassa do sistema radicular, – pivot ou raízes secundárias ( $\text{g g}^{-1}$ ): biomassa do sistema radicular, – pivot ou – raízes secundárias / biomassa total da planta; **S/R:** razão parte aérea / parte radicular

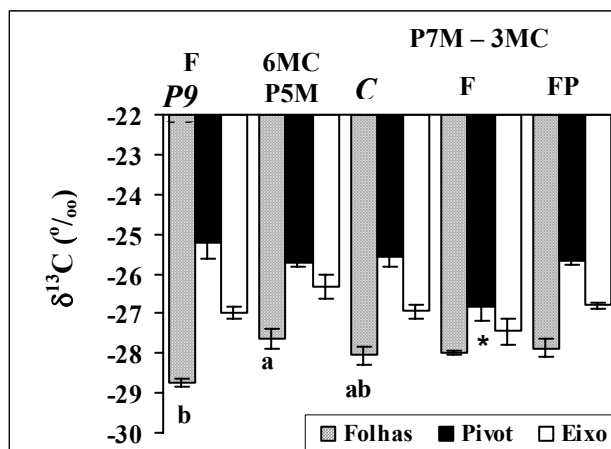
A concentração de amido no pivot foi idêntica para todos os tratamentos (c.a.  $343.6 \pm 2.1 \text{ mg g}^{-1}$ ) com excepção das plantas do nível 3MC não fertilizadas ( $283.9 \pm 6.3 \text{ mg g}^{-1}$ ). A concentração de amido no eixo foi significativamente mais baixa do que no pivot, mas sem diferenças entre tratamentos (Figura 7). A concentração em açúcares foi similar em todos os tratamentos e nas duas componentes da planta, excepto para as plantas jovens para as quais a concentração no eixo foi significativamente mais alta que no pivot (Figura 7).

A razão isotópica ( $\delta^{13}\text{C}$ ) das folhas (Figura 8) e a percentagem de azoto ( $\% \text{N}_2$ ) das folhas e do eixo (Tabela 4) encontram-se significativamente reduzidas nas plantas mais velhas (P9M-F) relativamente às plantas jovens provenientes de sementes conservadas (P5M-6MC e P7M-3MC). Contudo, a idade da planta não afectou a  $\delta^{13}\text{C}$  do pivot e do eixo nem a  $\% \text{N}_2$  do pivot (Tabela 4). As práticas do viveiro, por

sua vez, parecem não ter influenciado a razão isotópica da planta (Figura 8). Embora, a Anova tenha mostrado haver diferenças significativas da  $\delta^{13}\text{C}$  do pivot entre os tratamentos, o teste de Tukey não permitiu distingui-los. Esta razão foi significativamente mais baixa no pivot das plantas fertilizadas do que nas mais jovens.



**Figura 7.** Concentração e repartição dos açúcares (amido e açúcares solúveis) no pivot e no eixo das plantas de diferentes tratamentos. Valores são médias  $\pm$ Erro padrão. As diferentes letras indicam diferenças significativas ( $P \leq 0.05$ ) entre os tratamentos (minúsculas para o factor idade e maiúsculas para o factor práticas). \*: Diferenças significativas da repartição.



**Figura 8.** Efeito da idade e de práticas de viveiro na razão isotópica  $\delta^{13}\text{C}$  das folhas, pivot e eixo dos diferentes tratamentos. Valores são médias  $\pm$ Erro padrão. As diferentes letras indicam diferenças significativas ( $P \leq 0.05$ ) entre os tratamentos (minúsculas para o factor idade e maiúsculas para o factor práticas); \*: Diferenças significativas (t-test) entre P5M-6MC e P7M-3MC-F.

**Tabela 4.** Efeito da idade e das práticas de viveiro (Fertilização "F" e Fertilizadas e micorrizadas "FP") nas percentagens de carbono e de azoto das folhas, pivot e eixo das plantas dos diferentes tratamentos (T). Valores são médias  $\pm$ Erro padrão. As diferentes letras indicam diferenças significativas ( $P \leq 0.05$ ) entre os tratamentos.

N	T	% de carbono			% de Azoto		
		Folhas	Pivot	Eixo	Folhas	Pivot	Eixo
F	P9M	47.6 $\pm$ 1.2 a	47.1 $\pm$ 0.03 a	42.0 $\pm$ 1.4 a	1.2 $\pm$ 0.1 b	0.5 $\pm$ 0.01 a	0.4 $\pm$ 0.02 b
6MC	P5M	48.7 $\pm$ 1.4 a	45.5 $\pm$ 2.4 a	47.7 $\pm$ 2.3 a	1.8 $\pm$ 0.1 a	0.9 $\pm$ 0.03 a	0.6 $\pm$ 0.04 a
	P7M-C	52.3 $\pm$ 1.6 aA	42.9 $\pm$ 0.7 aA	48.0 $\pm$ 1.8 aA	1.7 $\pm$ 0.1 abB	0.9 $\pm$ 0.1 aA	0.6 $\pm$ 0.1 aA
3MC	_F	50.8 $\pm$ 1.9 A	45.9 $\pm$ 1.9 A	45.4 $\pm$ 1.7 A	2.1 $\pm$ 0.1 A*	1.5 $\pm$ 0.2 A*	0.6 $\pm$ 0.02 A
	_FP	47.4 $\pm$ 0.4 A	40.3 $\pm$ 0.9 A	46.4 $\pm$ 1.9 A	1.8 $\pm$ 0.04 B	1.4 $\pm$ 0.1 A	0.8 $\pm$ 0.01 A

## Discussão

Desde 1997/98 ano em que se iniciou o processo de certificação de plantas em Portugal (Portaria n.º 918/98, de 21 de Outubro), certificaram-se a 77% (40 milhões) do total de 52 milhões de plantas de diferentes espécies, segundo critérios baseados em parâmetros morfológicos (e.g. altura, razão parte aérea/raízes, conformação) (Ribeiro 2003). Ainda segundo esta fonte, as previsões da área a arborizar com sobreiro para os 4 anos seguintes são de cerca de 1600 ha/ano. Por outro lado, verifica-se pela concertação interprofissional entre os agentes da fileira da cortiça uma crescente preocupação com a reabilitação do montado, através da melhoria das práticas de produção de plantas e de gestão (Louro 2003).

Na maioria dos parâmetros analisados em 5 tratamentos de plantas produzidas de diferentes níveis fisiológicos de glandes, a redução da idade da planta à plantação exerceu um efeito positivo na sua qualidade morfológica e fisiológica. O crescimento exponencial das plantas jovens produzidas do nível 6MC (6 meses de conservação) é significativamente acelerado quando comparado ao das plantas mais velhas, tradicionalmente produzidas de glandes frescas (nível F) e, com menor relevância, ao das plantas originadas de sementes conservadas durante 3 meses (nível 3MC). Em condições controladas, foi já demonstrado o efeito benéfico da conservação das glandes no estado fisiológico da planta de 60 dias de idade (Merouani *et al.* 2001b). Em condições de viveiro verificou-se também uma boa correlação entre os níveis fisiológicos da glande e alguns novos parâmetros (e.g. emergência, uniformidade, crescimento juvenil) que condicionam a futura taxa de crescimento relativo da planta (TCR), conceito que integra os parâmetros de qualidade da planta (Villar *et al.* 2004). O tempo de emergência total das plantas ( $TE_t$ ) e o período para se atingir os 50% ( $TE_{50}$ ) são fortemente reduzidos nas plantas produzidas do nível 6MC quando comparados com os tempos do nível F e 3MC. A totalidade das plantas do nível 6MC emergiram 56 dias após a data de pré-germinação contra 84 dias para as do nível F. Consequentemente, obteve-se uma alta uniformidade na altura das plantas mais jovens, com cerca de 70% dentro do intervalo de 13-24 cm (ou 81% no primeiro mês de crescimento). Uma boa correlação foi obtida entre a média do tempo da emergência dos 50% das plantas ( $mTE_{50}$ ) e o TMG ( $R^2 = 0.96$ ), por um lado e a uniformidade da germinação da glande  $T_{75-25}$  ( $R^2 = 0.77$ ) por outro. Sabe-se que ocorrem alterações fisiológicas e bioquímicas durante a conservação das glandes. O grau de dormência cotilédona das glandes frescas (nível F) (Merouani 1996, Merouani *et al.* 2001a) desaparece completamente aos 3-4 meses de conservação em frio húmido (Merouani *et al.* 2001a), para surgir depois novamente uma dormência secundária aos 12-13 meses (Merouani *et al.* 2004). A dormência do epicótilo foi também encontrada nas plantas de sobreiro (Merouani *et al.* 2001b).

Se vários trabalhos experimentais concluíram que as reservas e o tamanho das sementes afectam o crescimento da planta (Andersson e Frost 1996, Merouani *et al.* 2001b, Kennedy *et al.* 2004), os presentes resultados demonstram que esta relação deve se à concentração de amido do eixo embrionário ( $R^2 = 0.99$ ) e não à dos cotilédones, representando o principal local de reservas. Apesar de a concentração de amido nos cotilédones das glandes do nível 3MC (TMG intermédio) representar 75% das reservas totais contra 65% para os níveis F e 6MC, o potencial de crescimento das plantas foi apenas intermédio. Também, a análise das reservas da planta (amido, açúcares) parece não depender da idade da planta, com excepção para as plantas do nível 3MC que mostraram uma redução da concentração de amido no pivot. Estes resultados sugerem que o crescimento juvenil das plantas depende não tanto da quantidade das reservas, mas provavelmente também da forma como são integrados os diferentes componentes (e.g. amido, proteínas, lípidos) em cada nível fisiológico da semente e, sobretudo, das condições do momento da produção (temperatura e humidade). A razão isotópica ( $\delta^{13}C$ ) das folhas das plantas mais velhas (P9M-F) foi significativamente mais baixa ( $-28.7 \pm 0.1$ ) relativamente à das plantas mais jovens ( $-27.9 \pm 0.1$ ). As médias da  $\delta^{13}C$  do pivot ( $-25.8 \pm 0.3$ ) e do eixo ( $-26.9 \pm 0.2$ ) de todos tratamentos são similares aos obtidos por Kennedy *et al.* (2004) que demonstrou haver uma tendência das folhas para deixar de usar as reservas cotilédonaes, 4 dias após a iniciação da actividade fotossintética.

As plantas com uma TCR elevada têm maior probabilidade de sobrevivência, estabelecendo rapidamente um sistema radicular profundo e ramificado, explorando um maior volume de solo que lhe permite uma nutrição mineral adequada e manter o seu potencial hídrico alto durante os períodos de secura (Leiva and Fernández-Alés 1998, Villar-Salvador *et al.* 2004). O maior crescimento, observado no primeiro mês, nas plantas jovens (P5M-6MC) relativamente às plantas mais velhas (P9M-F), atenuou as diferenças da TCR destes 2 tratamentos. Este facto resultou do período do ano em que este ocorreu e da supressão da dormência deste nível de semente (6MC). Contudo, observou-se um investimento significativamente maior no pivot das plantas jovens e uma tendência semelhante nas suas raízes secundárias. De facto, a razão biomassa das raízes secundárias relativamente ao pivot das plantas jovens, em condições controladas, foi significativamente mais alto reflectindo o seu maior crescimento.

Comparando o comportamento das plantas jovens do nível 6MC com as que foram fertilizadas do nível 3MC, verifica-se que só em alguns parâmetros (altura, diâmetro, R2N/Plt, NAR e %N do pivot) houve diferenças significativas em favor das fertilizadas. Todos os outros parâmetros estudados foram semelhantes. Contudo, as plantas mais jovens têm tendência a aumentar a fracção do sistema radicular (RMF) do que as plantas fertilizadas, especialmente em raízes secundárias (RMF R2<sup>a</sup>). Adicionalmente, a  $\delta^{13}\text{C}$  do pivot das plantas fertilizadas é significativamente mais baixo e a percentagem de azoto do pivot e do eixo significativamente mais altos do que nas plantas jovens. Isto significará, provavelmente, que as plantas fertilizadas preferem os nutrientes da solução nutritiva e deixaram de usar as reservas dos cotilédones. Sabe-se que a fertilização melhora significativamente o crescimento das plantas de diferentes espécies (Welander e Ottosson 2000, Fan *et al.* 2004, Villar-Salvador *et al.* 2004). Porém, uma forte fertilização pode prejudicar o sucesso da plantação induzindo uma redução da biomassa radicular e da tolerância à secura (Tan and Hogan 1995), e induzindo um aumento da área foliar, do tamanho do eixo e do S/R (Pardos e Montero 2000). Ao contrário, Villar-Salvador *et al.* (2004) mostrou que uma forte fertilização (145mg N, 16mg P e 34mg K/planta) em plantas de azinheira (*Q. ilex* L.) em viveiro pode melhorar o crescimento e a sobrevivência durante os dois primeiros anos após a instalação

Agradecimentos: Estamos gratos ao Prof. Henrique Ribeiro pela disponibilidade e orientação na fertilização no viveiro. Expressamos os nossos agradecimentos ao Dr. Daniel Moussain, Guy Ruize Catherine Pernault (INRA, França) pela implementação da técnica de micorrização. Este trabalho insere-se nas actividades dos Projectos CREOAK-QLK5-CT-2002-01594 e POCTI/41359/AGG/2001.

## Referências

- Andersson C. e Frost I. 1996. Growth of *Quercus robur* seedlings after experimental grazing and cotyledons removal. *Acta Bot. Neerland.* 45: 85-94.
- Bastien Y. 1992. Résultats de semis de glands de conservation en pépinière. *Rev. For. Fr.* XLIV, 5, 430-433.
- Broncano MJ, Riba M, Retana J. 1998. Seed germination and seedling performance of two Mediterranean tree species, holm oak (*Quercus ilex* L.) and alepo pine (*Pinus halepensis* Mill.): a multifactor experimental approach. *Plant Ecol.* 138, 17-26
- Carvalho J.B., Morais C.J.E., Análise da florestação em Portugal 1966-1995,- 1996- Reunião de Especialistas em Reabilitação de Ecossistemas Florestais Degradados. Instituto Florestal. Lisboa, Portugal.
- Colpaert JV, Van Laere A, Van Assche JA,. 1996. Carbon and nitrogen allocation in ectomycorrhizal and non-mycorrhizal *Pinus sylvestris* L. seedlings. *Tree Physiol.* 16, 787-793
- Fan Z, Moore JM, Wenny D. 2004. Growth and nutrition of container-grown ponderosa pine seedlings with controlled-release fertilizer incorporated in the root plug. *Ann. For.Sci.* 61, 117-124.
- Fuchs, M.A., Krannitz, P.G. & Harestad, A.S. 2000: Factors affecting emergence and first-year survival of seedlings of Garry oaks (*Quercus garryana*) in British Columbia, *Can. For. Ecol. Manage.* 137: 209-219.
- González-Ochoa AI, de las Heras J, Torre P, e Sánchez-Gómez E. 2003. Mycorrhization of *Pinus halepensis* Mill. and *Pinus pinaster* Aiton seedlings in two commercial nurseries. *Ann.For,Sci.* 60, 43-48.
- Halhoul, MN., Kleinberg I., 1972. Differential determination of glucose and fructose and glucose-and fructose-yielding substances with anthrone. *Annals of biochemistry.* 50: 337-343.  
<http://aob.oupjournals.org/content/vol190/issue4/images/data/485/DC1/Mcf214suppl.xls>.
- Hunt R Causton DR, Shipley B, Askew AP. 2002. a modern tool for classical growth analysis. *Annals of botany* 90: 485-488.
- ISTA, International Rules for Seed Testing 2003: Biochemichal test for viability. The topographical tetrazolium test.*

*Annexe to Chapter 6: Tetrazolium Test 6A-1.*

- Kennedy PG., Hausmann NJ., Wenk EH. E Dawson TE. 2004. The importance of seed reserves for seedling performance: an integrated approach using morphological, physiological, and stable isotope techniques. *Oecologia*. 141: 547-554.
- Kiriinya CK. 2001. Effects of seedlings duration in the nursery on the growth of trees in the field. Nursery production and stand establishment of broad-leaves to promote sustainable forest management. Palazzo Rospigliosi, Rome-7<sup>th</sup>-10<sup>th</sup> May 2001. (Resumo).
- Leiva MJ, e Fernández-Alés R. 1998. Variability in seedling water status during drought within a *Quercus ilex* subsp. *Bollota* population, and its relation to seedling morphology. *For. Ecol. Manag.* 111, 147-156.
- Louro, G. 1999: Avaliação da aplicação de programas de apoio à floresta na região do algarve, Direcção Geral das Florestas (DGF-Lisboa), Portugal, 29p.
- Louro, G. 2003: Informação técnica nº 4, Janeiro/Março, DVPF, DGRF
- Marianito, E.M.G. 2001. Efeito na qualidade das plantas da conservação de sementes de sobreiro no frio. *Rel. Trab. Final. Curso Eng. Florestal. ISA*
- McKay H.M., Jinks R.L., McEvoy C.,- 1999- The effect of desiccation and rough-handling on the survival and early growth of ash, beech, birch and oak seedling, *Ann. For. Sci.* 56: 391-402.
- Merouani H, J Minas, Almeida MH, Pereira JS. 2001a', A conservação da semente: uma solução para promover o montado. 4<sup>a</sup> Congresso Florestal "A Floresta na Sociedade do Futuro", Evora (Portugal), 28-30 de Novembro de 2001
- Merouani H., Branco C., Almeida M.H., Pereira J.S.,- 2001a- Comportement physiologique des glands de chêne liège (*Quercus suber* L.) durant leur conservation et variabilité inter-individus producteurs, *Ann. For. Sci.* 58:143-153.
- Merouani H., Branco C., Almeida M.H., Pereira J.S.,- 2001b- Effects of acorn storage duration and parental tree on emergence and physiological status of Cork oak (*Quercus suber* L.), *Ann. For. Sci.* 58:543-554.
- Merouani H., Trubat R., Lourenço MJ., Sampaio T., Santos ML., Cortina J., Pereira JS. e Almeida MH. 2004. Le développement de champignons, un facteur limitant la conservation à long terme des glands de chêne-liège (*Quercus suber* L.). 4<sup>o</sup> Meeting IOLB, Hammamet, Tunisia 5-9 Octobre 2004. *Boletim de IOLB, (in press)*
- Merouani, H., Branco, M., Almeida, M.H. & Pereira. J.S. 2001c: – A conservação a longo prazo de sementes de sobreiro. *Manual prático. Ed. G Priod, I. Monteleone and P. Belletti., 23 p.*
- Merouani; M.H. Almeida; J.S. Pereira 2004. - Effects of precondition drying on the success of long-term storage of oak cork (*Quercus suber* L.) acorns. *Ann. For. Sci. (submetido 2004)*.
- Nardini A, Salleo S, Tyree MT, e Vertovec M. 2000- Influence of the ectomycorrhizas formed by *Tuber melanosporum* Vitt. On hydraulic conductance and water relations of *Quercus ilex* L. seedlings. *Ann. For. Sci.* 57: 305-312.
- O'Reilly C., McCarthy N., Keane M., Harper C.P., Gardiner J.J.,- 1999- The physiological status of Douglas fir seedlings and the field performance of freshly lifted and cold stored stock, *Ann. For. Sci.* 56: 391-402
- Pardos M e Montero G. 2000. Seedling quality. *Specila reference to cork oak. Mediterranean Silviculture with emphasis in Quercus suber, Pinus pinea and Eucalyptus sp.* IUFRO meeting, Seville. (May 2000)., 5-25
- Rey-Benayas JM, 1998. Growth and mortality in *Quercus ilex* L. seedlings after irrigation and artificial shading in Mediterranean set-aside agricultural lands. *Ann. Sci. For.* 55, 801-807.
- Ribeiro D. 2003. Informação técnica nº 4, Janeiro/Março, DVPF, DGRF.
- Ritchie GA, 1984. Assessing seedling quality, in: Durey ML., Landis TD, Eds. *Forest Nursey Manual: Production of bareroot seedlings*, Martinus Nijhoff/Dr. W. Junk Publishers, The Hague/Boston/Lancaster, 243-259.
- Silva C e Ribeiro D. 2003. Informação técnica nº 4, Janeiro/Março, DVPF, DGRF
- Tan W e Hogan GD, 1995. Effects of nitrogen limitation on water relations of jack pine (*Pinus banksiana* Lamb.) seedlings. *Plant Cell. Environ.* 18, 757-764.
- Teixeira A. 2003. Informação técnica nº 4, Janeiro/Março, DVPF, DGRF
- Tinus, R.W. 1996: Root growth potential as an indicator of drought stress history, *Tree Physiol.* 16: 795-799.
- Villar R, Ruiz-Robledo J, Quero JL, Poorter H, Valladores F, Marañón T. 2004. Tasas de crecimiento en espécies leñosas: aspectos funcionales e implicaciones ecológicas. *Ecologia del bosque mediterráneo en un mundo cambiante.* Ministério de Médio Ambiente, EGRAF, SA, Madrid, 191-227.
- Villar-Salvador P, R Planelles, Enríquez E, Peñuelas Rubira J. 2004. Nursery cultivation regimes, plant functional attributes, and field performance relationships in the the Mediterranean oak *Quercus ilex* L. *For. Ecol. Manage.*, 196, 257-266
- Welander NT e Ottosson B., 2000. The influence of low light, drought and fertilization on transpiration and growth in young seedlings of *Quercus robur* L. *For. Ecol. Manage.* 127, 139-151.

#### **4. Conclusão geral**

Foi desenvolvido um novo procedimento de conservação da lande do sobreiro por um período de 12-15 meses (12-15MC) e implementado com êxito à escala de viveiro e de campo em diferentes projectos europeus e nacionais. É um processo aplicável para outras Quercíneas desde que os requisitos básicos sejam respeitados e dos quais é de salientar o conhecimento das características morfológicas (teor da água das diferentes componentes), fisiológicas (grau de dormência primária) e sanitárias (grau de ataque e infecção) da semente madura (estado fresco), o controlo da sua maturação para garantir uma eficiência da apanha (qualidade, quantidade e custo), o rigor e rapidez dos tratamentos (termoterapia, secagem) e a adequação das condições de conservação (tipo de saco, temperatura e humidade relativa da câmara). Trata-se de um processo tecnológico patenteado® que altera radicalmente o procedimento tradicional de conservação e com desenvolvimento de um prototipo eficaz (fiabilidade, rapidez de processamento e eficiência energética) para tratar, analisar e conservar quantidades à escala comercial.

As vantagens desta inovação são inúmeras; para além dos ganhos económicos, quer ao nível de viveiro quer de campo (redução dos desperdícios), a planificação das acções torna-se flexível ao longo do ano, permitindo assim duplicar ou triplicar as produções e as instalações com um máximo aproveitamento das condições favoráveis ao crescimento do material florestal de reprodução (MFR). À escala laboratorial, as experimentações serão, de ora avante, contínuas e não irão ficar constringidas ao único e curto período da queda natural das sementes (Outubro-Dezembro), o que irá certamente beneficiar o desenvolvimento científico das Quercíneas em geral e do sobreiro e azinho em particular. Com o efeito positivo dos tratamentos e do frio húmido (desinfecção, quebra de dormência primária) e a redução do tempo de produção, a qualidade da semente morfológica e fisiológica da semente conservada e da planta produzida desta é inigualável. De facto, a germinação da semente conservada torna-se rápida e uniforme e o potencial de crescimento das raízes (PCR) é significativamente superior ao da planta convencional e

similar ao da planta fertilizada. Associando estas vantagens com o aperfeiçoamento das práticas silvícolas (qualidade genética da semente, escolha do terreno, cova profunda, protecção), o sucesso de reflorestação será obviamente melhorado.

Em todos os estudos de silvicultura e particularmente das Quercíneas, algumas perguntas podem ficar pendentes devido a lentidão das respostas (espécies de crescimento lento) e a dificuldade de resolver algumas situações como por exemplo as infecções. O nosso estudo não foge a regra e, portanto, deixa pendente o problema da proliferação de fungos após o primeiro ano de conservação.

## **Anexos**

- 1- Registos de patente: Portugal, Marrocos e Espanha
- 2- Homologação da Agência da Inovação para a criação da empresa de base tecnológica (Iniciativa Neotec - Medida 7.2 do POS\_Conhecimento)
- 3- Manual prático do processamento e conservação da semente.

# BOLETIM DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL

*Nº 2008/12/31 (254/2008)*

*31 de DEZEMBRO de 2008*

Processo	Início de vigência	Data do despacho	Nome do 1º requerente/titular	País resid.	Classificação principal	Observações
103611	2006.12.06	2008.12.22	HACHEMI MEROUANI	PT	<i>A01N 3/00</i> (2006.01)	sofreu alterações em sede de exame.
103751	2007.05.24	2008.12.22	SWISS GROUP OF COMPANIES IMPORTAÇÃO E EXPORTAÇÃO, LTDA.	BR	<i>F26B 3/347</i> (2006.01)	



# BREVET D'INVENTION

## TITRE OFFICIEL

Loi n° 17/97  
relative à la protection de la propriété industrielle  
telle que modifiée et complétée

N° DE BREVET : 29590

DATE DE DELIVRANCE : 01 JUILLET 2008

# BREVETS D'INVENTION

Loi n° 17/97 relative à la protection de la propriété industrielle

N° DE DEPOT DE LA DEMANDE : 30414	N° DE BREVET: 29590
DATE DE DEPOT DE LA DEMANDE : 22/11/2007	DATE DE DELIVRANCE: 01/07/2008

## INTITULE DE L'INVENTION:

"PROCEDE DE CONSERVATION DE SEMENCES DE CHÊNE-LIEGE ET/OU SEMENCES RECALCITRANTS"

## DEPOSANT(s):

INSTITUTO SUPERIOR DE AGRONOMIA // TAPADA DA AJUDA 1349-017, LISBOA; PORTUGAL

HACHEMI MEROUANI // AVENIDA MARCOS PORTGAL, N°.11-1° Esp. 2845-545 AMORA-SEIXAL; PORTUGAL

## MANDATAIRE:

ABU-GHAZALEH INTELLECTUAL PROPERTY (TMP AGENTS) //Espace Porte d'anfa N°3 Rue Bab Mansour  
CASABLANCA

## INVENTEUR(S)

JOAO MANUEL DIAS DOS SANTOS PEREIRA ; MARIA HELENA REIS DE NORONHA RIBEIRO DE ALMEIDA ; HACHEMI MEROUANI ;

REVDICATION DE PRIORITE(S):	N°de dépôt	Date	Pays
	103611	06/12/06	PORTUGAL

DATE D'EXPIRATION DU BREVET: 22/11/2027

B

Casablanca, le 01/07/2008  
P. Le Directeur de l'O.M.P.I.C  
Le Chef du Département Brevets, Dessins  
et Modèles Industriels

Signé : NAFISSA BELCAID



- [11] 2337117 A1 [21] P 200703228 (7)  
 [22] 04-12-2007  
 [71] PT Instituto Superior de Agronomia y otros  
 Tapada de Ajuda  
 1349-017 Lisboa PT  
 [51] A01F 25/00 (2006.01)  
 [30] 06-12-2006 PT 103611  
 [52] Proceso de conservación de semillas de alcornoque y/o semillas recalcitrantes.  
 [57] Proceso de conservación de semillas de alcornoque y/o semillas recalcitrantes.  
 La presente invención consiste en un proceso de conservación de bellota y/u otras semillas recalcitrantes. La técnica de conservación desarrollada se centra esencialmente en el control de dos áreas: las exigencias intrínsecas de la semilla (su estado hídrico y fitosanitario) en el momento de la recolección, durante el secado y a lo largo de la conservación, y las exigencias extrínsecas (tipo de saco, la temperatura y humedad relativa de las cámaras de conservación). Así, además de desarrollar un proceso de conservación más eficiente y eficaz, también da lugar a un producto de mucha más calidad.

[74] Arizti Acha, Mónica

- [11] 2337119 A1 [21] P 200801450 (9)  
 [22] 19-05-2008  
 [71] ES Talleres de Escoriaza, S. A.  
 Barrio Ventas, 35  
 Irún (Guipúzcoa) ES  
 [51] E05C 9/02 (2006.01) E05C 9/18 (2006.01)  
 [52] Mejoras en la patente de invención p-200703137 por "Cerradura central para sistema de cierre multipunto con reenvíos automáticos".  
 [61] P 200703137 (X), solicitado el 09-11-2007.  
 [57] Mejoras en la Patente P-200703137 "Cerradura central para sistema de cierre multipunto con reenvíos automáticos", donde la regla vertical (1) posee una prominencia transversal (1f) estando su altura ajustada por defecto a través de una abertura (4c) practicada en un suplemento de nueca (4) que proyecta hacia arriba un brazo radial (4d) que, entre sus posiciones accionada y de reposo, está impulsado por el propio muelle recuperador (15) del picaporte de cierre (6); dicha abertura (4c) del suplemento de nueca (4) tiene un canto inferior (4e) sobre el que descansa un resalto inferior (1g) de la prominencia transversal (1f) en la posición inferior de reposo de la regla vertical (1) en conjunción con la posición de reposo del suplemento de nueca (4) y con la posición extendida de reposo del picaporte de cierre (6); al tiempo que esta abertura (4c) del suplemento de nueca (4) tiene un canto superior (4f) que, con una holgura conveniente, queda adyacente sobre un resalto superior (1h) de dicha prominencia: transversal (1f).

[74] Izquierdo Faces, José

- [11] 2337118 A1 [21] P 200800869 (X)  
 [22] 28-03-2008  
 [71] ES Quality Espresso, S. A.  
 Motores 1-9  
 Barcelona ES  
 [51] A47J 31/06 (2006.01) A47J 31/44 (2006.01)  
 [52] Portacacillos para máquina de café.  
 [57] Portacacillos para máquina de café.  
 Comprende un recipiente (10) acoplado a un mango. Dicho recipiente (10) define un alojamiento (11) para recibir un cacillo amovible, y está unido por una cara exterior (13) a un cuerpo distribuidor (12) mediante un elemento de fijación dispuesto a través del fondo del recipiente (10) con un orificio de paso.

[74] Torner Lasalle, Elisabet

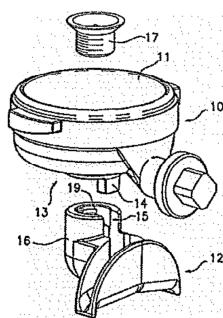


Fig. 1

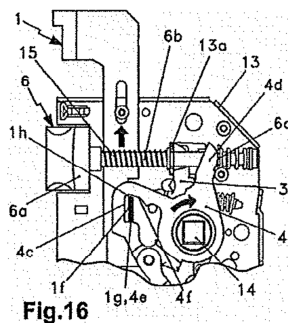


Fig. 16

- [11] 2337120 A1 [21] P 200801467 (3)  
 [22] 20-05-2008  
 [71] ES Telefónica, S. A.  
 Gran Vía, 28  
 Madrid ES  
 [51] H04L 12/18 (2006.01)  
 [52] Distribución de flujos multimedia de banda ancha en conexiones Wifi.  
 [57] Distribución de flujos multimedia de banda ancha en conexiones Wifi presenta una solución basada en encapsular proporcionada por un mecanismo de tunelización el tráfico IP Multicast mediante túneles IP Unicast. Estos túneles se definen a nivel IP y se pueden establecer, según el caso, entre el equipo de acceso del proveedor y el descodificador (STB), o bien entre el módem-router WiFi del usuario y el descodificador (STB) del servicio de distribución de televisión digital.

[74] Arizti Acha, Mónica



⑪ Número de publicación: **2 337 117**

⑫ Número de solicitud: 200703228

⑮ Int. Cl.:  
**A01F 25/00** (2008.01)

⑫

SOLICITUD DE PATENTE

A1

⑲ Fecha de presentación: <b>04.12.2007</b>	⑰ Solicitante/s: <b>Instituto Superior de Agronomía Tapada da Ajuda 1349-017 Lisboa, PT Hachemi Merouani</b>
⑳ Prioridad: <b>06.12.2006 PT 103611</b>	
⑳ Fecha de publicación de la solicitud: <b>20.04.2010</b>	⑳ Inventor/es: <b>Merouani, Hachemi; Dias Dos Santos Pereira, Joao Manuel y Reis de Noronha Ribeiro de Almeida, Maria Helena</b>
⑳ Fecha de publicación del folleto de la solicitud: <b>20.04.2010</b>	㉑ Agente: <b>Arizti Acha, Mónica</b>

㉒ Título: **Proceso de conservación de semillas de alcornoque y/o semillas recalitrantes.**

㉓ Resumen:  
Proceso de conservación de semillas de alcornoque y/o semillas recalitrantes.  
La presente invención consiste en un proceso de conservación de bellota y/u otras semillas recalitrantes. La técnica de conservación desarrollada se centra esencialmente en el control de dos áreas: las exigencias intrínsecas de la semilla (su estado hídrico y fitosanitario) en el momento de la recolección, durante el secado y a lo largo de la conservación, y las exigencias extrínsecas (tipo de saco, la temperatura y humedad relativa de las cámaras de conservación). Así, además de desarrollar un proceso de conservación más eficiente y eficaz, también da lugar a un producto de mucha más calidad.

ES 2 337 117 A1

Exmo Senhor  
Hachemi Merouani  
Avenida Marcos Portugal, nº 11, 1º Esq.  
2845-111 Amora

N/Refa  
14.03.2007\* 1349

Lisboa, 14 de Março de 2007

**Assunto:** Iniciativa NEOTEC – Medida 7.2 do POS\_Conhecimento Homologação

Temos o prazer de comunicar a V. Exa que foi homologada a 23 de Fevereiro de 2007 pelo Senhor Ministro da Ciência, Tecnologia e Ensino Superior a candidatura FILFLOR, aprovada em Unidade de Gestão a 30 de Janeiro de 2007. Esta homologação atribui o financiamento à Fase 2 do projecto FILFLOR, no valor de 14.175,00 €, no âmbito do Programa Operacional Sociedade do Conhecimento.

Com os melhores cumprimentos,



Lino Fernandes  
Presidente do Conselho de Administração



# **A conservação a longo prazo de sementes do sobreiro**



FAIR5-CT97-3480



Dezembro 2001

Publicação produzida no âmbito do projecto Europeu

**FAIR5-CT97-3480**

*(Optimization of cork-oak seed management in support of  
Community policies for reforestation and cork production)*

Texto escrito por:

- **Hachemi Merouani, Manuela Branco, João Santos Pereira, Maria Helena Almeida** (Instituto Superior de Agronomia, Departamento de Engenharia Florestal, Lisboa, Portugal)

Com a colaboração de:

- **Piero Belletti, Ignazio Monteleone** (DIVAPRA Agricultural Genetics, University of Turin, Italy)
- **Steven P.C. Groot, Karine Tesnier** (Plant Research International, Wageningen, The Netherlands)
- **Eduardo Sobrino** (Universidad Politécnica de Madrid, Departamento de Producción Vegetal, Madrid, España)
- **Antonella Muroli, Anna Cerboneschi, Clizia Sechi, Pino Ruiu** (Stazione Sperimentale del Sughero, Tempio Pausania, Italy)
- **Maria Lourdes Santos** (Estação Florestal Nacional, Lisboa, Portugal)
- **José de la Plaza** (Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Instituto del Frío, Madrid, España)

Editado por:

- Graziella Priod, Ignazio Monteleone e Piero Belletti (DIVAPRA Agricultural Genetics, University of Turin, Italy)

Este trabalho foi em parte financiado pelo Ministério da Agricultura, Gestão da Natureza e Pescas da Holanda (DWK 338)

## Introdução

O sobreiro desempenha um importante papel ecológico e sócio-económico. Contudo, actualmente considera-se que se encontra em perigo de regressão devido às fortes pressões antropogénicas e ambientais. A estes condicionalismos há a acrescentar a dificuldade da sua regeneração natural.

A irregularidade na produção de sementes é bem conhecida no sobreiro. A um ano de safra (maior produção) podem seguir-se 2 a 5 anos de contra-safra (menor produção). A este problema, adiciona-se a dificuldade de germinação de sementes frescas devido a sua dormência. A lentidão do processo germinativo aumenta os riscos de ataque por roedores e da perda de viabilidade da semente resultante da sua desidratação.

A conservação da semente contribui para superar estes problemas e pode ser uma alternativa para a reflorestação e rejuvenescimento do sobreiro.

Até agora, devido a uma inadequação no processamento das sementes do sobreiro e à utilização de equipamentos inapropriados, os viveiristas têm tido dificuldades na sua conservação por longo períodos. A conservação a longo prazo de sementes recalcitrantes é uma tarefa complexa mas possível se algumas das antigas práticas forem substituídas.

O sucesso da conservação requer muita atenção durante todo o processo, a partir da colheita. Precisam de ser cuidadosamente avaliadas e testadas etapas como a maturação da semente, momento da colheita (estado fisiológico), ritmo de secagem, o conteúdo em água, o tratamento com a termoterapia, o tipo de saco utilizado na conservação.

O **objectivo** deste manual é disponibilizar os conhecimentos adquiridos durante 3 anos de experiências na conservação de sementes de sobreiro (**Projecto Europeu FAIR5-CT97-3480**), descrevendo os aspectos práticos para assegurar a sua conservação a longo prazo.

## Colheita da semente: Onde, Como e Quando?

Sabe-se que a sobrevivência e a produção das plantas são afectadas pela qualidade de sementes. De facto, para assegurar uma elevada qualidade de sementes, devemos colher em:

povoamentos puros  
e árvores saudáveis



Evitar a recolha em árvores  
isoladas devido à consanguinidade



Para prever o período de maturação, são necessárias observações prévias e determinações do teor de humidade das sementes. Quando a maturação está completa, a teor em água das sementes varia entre 43 e 50% correspondendo a cerca de 42% nos cotilédones. Esta humidade parece ser um bom indicador da maturidade das sementes.

Os povoamento e as árvores são, então, seleccionados e identificados.

A maturação é afectada por condições climatéricas e ambientais. Em Portugal, a maturação ocorre entre 10 e 25 de Novembro.

## Como prever a maturidade

O sucesso da conservação começa com a colheita. Se as sementes não estiverem maduras a sua taxa de germinação vai ser fraca e perdem a sua viabilidade durante a conservação.

Durante a maturação, o peso das sementes aumenta até atingir o valor final, variando entre localidades e árvores mães, tornando-se o pericarpo progressivamente castanho.



Quando as sementes começam a cair (1<sup>a</sup> semana de Novembro), a maioria das que permanecem na árvore estão normalmente maduras. **Neste momento os meios devem ser orientados no sentido de organizar a colheita.** Foi demonstrado que a demora na colheita e o estado das sementes (frescas ou desidratadas) afecta claramente o sucesso da conservação.

**1-** Instale redes por baixo das copas de todas as árvores seleccionadas, ou limpe o chão para eliminar as sementes já caídas. Ou simplesmente desloque a rede entre as árvores seleccionadas.



**2 –** Coloque uma corda à volta dos ramos finos e abane ligeiramente para induzir a queda. Assim, as sementes destacam-se facilmente das cápsulas sem se danificar.

**3 -** Reúna uma equipa de apanha para reduzir ao máximo o tempo de colheita. Recolha as sementes caídas na rede e coloque-as em sacos de rede para evitar uma atmosfera confinada.



A colheita tradicional é geralmente um processo muito lento. Ele consiste em recolher as sementes do chão durante um longo período, aumentando o risco de perda da sua viabilidade e da sua pré-germinação, reduzindo portanto a possibilidade da sua conservação. A perda de viabilidade das sementes pode ser devida quer a ataques de pragas e fungos quer à sua desidratação.

A vantagem de colheita controlada é a redução da duração de colheita, permitindo assim fornecer sementes frescas com elevada qualidade. As sementes podem também ser apanhadas do chão se tiverem caído recentemente.

Escolha sementes  
verdes-acastanhadas,  
cor indicativa da sua  
recente queda

Evite misturar  
sementes apanhadas  
do chão com aquelas  
colhidas da árvore

## Sinais do mau estado das sementes

**A cor clara**  
indica que as sementes estiveram no chão durante muito tempo, risco de desidratação.

**A cor escura**  
indica que as sementes foram totalmente infestadas por fungos. Por vezes as sementes parecem estar boas, mas podem estar infestadas no interior.



**! Não recolha !**



**Buracos na semente:**  
o *Curculio elephas* ataca as sementes na árvore, consome as reservas, afecta negativamente o desenvolvimento das plantas.

**Forma irregular:**  
a alteração da forma pode indicar ataque de insectos.



As plantas resultantes de sementes atacadas exibem uma fraca taxa de desenvolvimento e baixa produção de biomassa

## **Manuseamento e transporte de sementes**

O manuseamento inadequado das sementes desde a colheita e durante o processamento pode drasticamente afectar a sua viabilidade durante a conservação.

Separar as sementes  
apanhadas da árvore  
daquelas apanhadas do  
chão

Evite deixar as sementes ao sol

**Devido a sua alta actividade  
metabólica (sementes  
recalcitrantes), as sementes  
devem ser colocadas em sacos de  
rede ou em caixas perfuradas  
para permitir o seu arejamento.**

Evitar o uso de sacos de plásticos

Durante o transporte, as sementes precisam de estar bem ventiladas e não devem ser expostas a temperaturas elevadas. Assim:

Use veículos cobertos ou refrigerados

Os sacos não devem ser empilhados para não serem criadas condições de anaerobiose

Evite deixar os sacos ao sol ou dentro de veículos fechados

**O sucesso da conservação depende muito da rapidez do processamento. Portanto as sementes colhidas diariamente (se for uma grande quantidade) ou no máximo durante 3 dias devem ser imediatamente preparadas para a conservação.**

Se a colheita é efectuada durante 3 dias, as sementes devem ser guardadas em local fresco (4-5°C) para minimizar a perda de água

## Conservação da Semente:

### Limpeza

Geralmente, na recepção as sementes apresentam impurezas tais como folhas, sementes vazias, ramos....etc.

Limpe as sementes para tornar a conservação mais fácil e assegurar uma alta qualidade de sementes

## Como limpá-las?

Submirja as sementes em água mexendo ligeiramente

As impurezas (folhas, ramos, sementes vazias) vão flutuar



As sementes saudáveis vão afundar-se.



Esta etapa torna-se mais fácil e rápida se a colheita tiver sido feita com redes ou a partir do chão depois de limpo

Retire todas as sementes que flutuam



Contudo, algumas sementes com buracos podem também afundar-se.

Portanto, deve

## **Escolher à mão**

Remova os restantes impurezas (ramos...)

Elimine todas as sementes com buracos e com pericarpo escuro (totalmente infestadas por fungos)



## Tratamento das sementes

# Termoterapia

O tratamento térmico é uma etapa indispensável para garantir o sucesso da conservação por um longo período. Este tratamento ( $45 \pm 1^\circ\text{C}$  por 2 horas) provou ser eficaz contra as larvas de *Curculio elephas*, *Lepidoptera Tortricidae* e a proliferação dos fungos.

## Como tratá-las?

Imediatamente depois da limpeza, as sementes devem ser submersas em água previamente aquecida a  $45^\circ\text{C}$

Com a submersão a temperatura baixa, espere até atingir  $45^\circ\text{C}$  e aguarde 2 horas

Volte a eliminar as sementes que flutuam  
Ocasionalmente remexa para uniformizar a temperatura



Depois do tratamento térmico deixe-as a drenar por algum tempo

Provamos que a termoterapia não afecta a qualidade das sementes e das plantas.



Depois de 1 a 2 horas de drenagem, a **qualidade das sementes** deve ser avaliada antes de as secar e conservar.

Os parâmetros mais práticos de avaliação de qualidade de sementes para confirmar que são viáveis e ter uma referência para o grau de secagem vão ser descritos em anexo.

**Teor em água**

**Germinação**

**Libertação de  
Electrólitos pelo Embrião**

## Fase de secagem

A viabilidade das sementes durante a conservação depende essencialmente do teor de água de sementes e/ou do embrião

A fase de secagem é necessária para evitar a pré-germinação dentro dos sacos. Esta pode ocorrer se as sementes forem conservadas com uma humidade inicial (42-47%) ou logo após a colheita



	Perda de água (%)		Tempo conservação (meses)			
	Bolota	Embrião	1	3	6	13
Conservadas após colheita (42-47%)	0	0	0	0	10.7	42.9
	0	0	0	0	21.1	65.4
Conservadas após secagem moderada (40-41%)	4.7	0.2	0	0	0	0
	1.2	0.2	0	0	0	3.5
Conservadas após secagem excessiva (31%)	14	12.8	0	0	0	0

% de pré-germinação dentro dos sacos de conservação

Contudo, a secagem não deve ser excessiva uma vez que leva à morte de sementes

# Como secar?

A secagem deve ser feita em câmara com ar forçado

Ajuste a temperatura e humidade relativa (HR) a 30°C e 30% HR

Espalhe as sementes em camadas finas (<10 cm) em contentores abertos e coloque-os dentro da câmara

**Se a câmara não estiver equipada com ar forçado,**

use soluções saturadas de sais minerais (cloreto de cálcio  $CaCl_2$ , cloreto de lítio  $LiCl_2$ , sílica gel..)  $CaCl_2$  mantém a HR de 30% a 25°C é barato

Como é difícil controlar a HR da câmara, devido à evaporação das sementes, recomenda-se que se use uma **câmara com ar forçado para evitar a acumulação de humidade.**

Mexa ocasionalmente as sementes.

Nestas condições, 24 a 36 horas são suficiente para atingir **a humidade desejada de sementes.**



**A humidade óptima das sementes para assegurar a conservação deve ser entre 40-42%**

### *Tradicionalmente,*

as sementes são conservadas em sacos de rede sem qualquer tratamento, excepto a aplicação de fungicida. A porosidade excessiva dos sacos leva a elevadas trocas gasosas e induz a perda de viabilidade de sementes.

A conservação nestes tipos de sacos levou á morte de 60% de sementes ao fim de 4 meses de conservação devido a sua desidratação.

## **Como conservar?**

Quando a humidade desejada (40%) é obtida, as sementes devem ser retiradas da câmara e **imediatamente** conservadas para evitar alterações fisiológicas indesejáveis e a condensação de água nas paredes dos sacos.



Pese e distribua as sementes em sacos de polietileno de 30-50  $\mu\text{m}$  de espessura. Estes tipos de saco reduzem a perda de água e permitem que o  $\text{CO}_2$  atinja uma concentração de 1-4% dentro do saco.

Adicione fungicida para prevenir o desenvolvimento dos fungos



Sele bem os sacos

A quantidade de sementes não deve ser grande uma vez que as paredes dos sacos são frágeis:

- Manipule cuidadosamente os sacos
- Não coloque mais do que 15-20 kg para facilitar o manuseamento
- Evite empilhar os sacos de sementes

Coloque os sacos em contentores abertos para permitir a circulação do ar



Conserve os contentores a  $0 \pm 1^\circ\text{C}$  numa câmara com controle de temperatura

Por vezes, devido ao empilhamento dos contentores, ocorre condensação da humidade nas paredes dos sacos. Troque a posição dos contentores para evitar esta situação.



## **Anexo**

### **Qualidade da semente**

A reflorestação em todo o mundo, e particularmente com o sobreiro nas regiões mediterrânicas requer cada vez mais plantas de qualidade. É sabido que a qualidade das plantas é afectada pela qualidade de sementes. A certificação de sementes, que estandardiza a sua qualidade com a identidade específica, origem, características genéticas e pureza dos lotes, é agora adoptada por muitos países. A qualidade da semente depende de muitos factores, entre os quais pureza, peso, teor de humidade, viabilidade da semente e estado sanitário.

### **Viabilidade**

Tradicionalmente os testes de germinação e de tetrazolium, utilizando os métodos da ISTA (International Seed Testing Association), são frequentemente utilizados para testar a viabilidade das sementes. Contudo, as desvantagens destes métodos porque o primeiro é moroso (pelos o menos 28 dias) a obtenção dos resultados, e o segundo porque é subjectivo. Por conseguinte, alguns países (Canada, USA) não reconhecem o teste de tetrazolium oficialmente ou encorajam que seja seguido por um teste de germinação.

A viabilidade de sementes é a primeira informação exigida pelo consumidor.  
No caso do sobreiro, em que as sementes são muito sensíveis (**recalcitrantes**).  
**O longo período para obtenção dos resultados, pode ser uma desvantagem.**



Como tal, no interesse das duas partes (vendedor e comprador), é de desenvolver métodos rápidos e fiáveis como substitutos para o teste de germinação.

Nesta óptica, o Instituto Superior de Agronomia, Universidade Técnica de Lisboa (Portugal), parceiro no Projecto Europeu FAIR5 CT5-3480, tem desenvolvido um método rápido e inovador:  
a **Libertação dos Electrólitos do Embrião** e a **Humidade do Embrião** são técnicas fiáveis para avaliar rapidamente a capacidade germinativa das sementes.

O objectivo principal do viveirista é obter uma elevada percentagem de germinação de forma rápida e uniforme. Isto é quase impossível com sementes frescas uma vez que estão dormentes. Portanto, a conservação pode ser uma alternativa.

A conservação melhora a % de germinação (mais de 92% no caso das sementes conservadas *contra* 86% no caso das frescas), reduz significativamente o tempo de emergência das plantas (22 dias *contra* 33 dias, respectivamente) e melhora a uniformidade de emergência das plantas.

## Como germinar?

**1** ▶ Mergulhe as sementes 48 horas em água a 20°C (ou dentro de uma estufa)

**2** ▶ Desinfecte-as com cloreto de sódio a 80% durante 10-15 minutos

**3** ▶ Coloque-as num substrato (turfa, areia) esterilizado e húmido. O substrato deve ser mantido sempre húmido. Ocasionalmente molhar o substrato com Thiram (1.5 g/l)

**4** ▶ Efectue os testes de germinação, numa estufa a 20°C

As sementes são consideradas germinadas quando emite uma radícula de 0.5-1 cm

## **Testes de Emergência**

Nem todas as sementes germinadas são capazes de desenvolver plantas normais e saudáveis. Os testes de emergência avaliam o número de plantas que podem ser obtidas por lote de sementes. As sementes são semeadas em contentores contendo areia e turfa (1:1). Os contentores são colocados na estufa e regadas regularmente. Semanalmente é registado a emergência das plantas. Os testes de emergência requerem mais tempo que os testes de germinação, mas após 6 semanas é já possível recolher dados, nomeadamente o diâmetro de colo, altura do eixo, o comprimento das raízes, o número de folhas, a biomassa produzida.

## **Testes inovadores, rápidos**

O embrião é a parte viva e activa de semente, responsável pelo desenvolvimento da planta (raiz e eixo). Portanto, o seu estado hídrico e a integridade das suas membranas devem estar em óptimas condições.

# Humidade

Geralmente nas análises, apenas o teor de água da semente inteira é avaliado. Por vezes, a humidade das sementes colhidas no mesmo local pode ser diferente. Esta diferença pode resultar da espessura do pericarpo que varia entre árvores. Pelo contrário, o teor de humidade dos cotilédones e do embrião é muito mais uniforme entre sementes de árvores diferentes.

A determinação da humidade dos cotilédones e do embrião é recomendada para a consistência dos resultados.

Geralmente, a humidade do embrião das sementes frescas varia com o local da colheita entre 56 a 62%.

Quando a sua humidade desce dos 50% a germinação é afectada.

## Como?

- Determine a humidade em pelo menos 3 replicações de amostras compósitas de 15 sementes ou individualmente em 25 sementes
- Remova o pericarpo e corte a metade basal do cotilédone e pese-o (PF)
- Seque as amostras por 17 horas a  $103 \pm 2^\circ\text{C}$
- Depois disto, coloque-as no exsiccador durante 40 minutos
- Pese-as de novo (PS)
- Para determinar o teor de humidade do embrião adopte o mesmo procedimento utilizando apenas o embrião

**Calcule a Humidade (%H):**

$$\%H = (PF - PS) \times 100 / PF$$

## Libertação dos Electrólitos do Embrião (LEE)

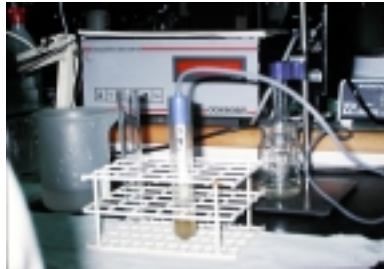
Inicialmente, a LEE era usada para avaliar os danos, em folhas e raízes, causados por os vários factores (o frio, o calor, a seca, os contentores...).

Esta técnica tem como hipótese que as membranas de tecidos danificados libertam mais electrólitos das células do que as dos tecidos intactos.

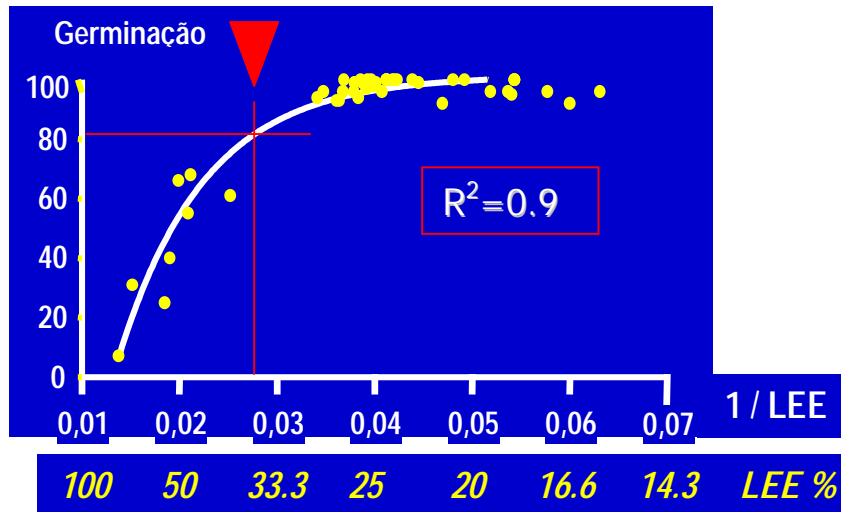
A determinação da LEE deve ser feita em pelo menos 30 embriões por cada lote de 100 kg.

▶▶ Mais de 60 experiências de 30 embriões cada foram feitas durante 4 anos

▶▶ Diferentes estados fisiológicos de sementes (fresca, secas a diferente humidade, conservadas, atacadas ou não...) são testados para avaliar a integridade das membranas do embrião e seguida sempre de teste de germinação e da determinação de humidade do embrião



O método mostra uma boa correlação ( $R^2 = 0.93$ ) entre o teste de germinação e o  $1/LEE$  como ilustra a Figura.



Esta técnica rápida e viável, mostra que a viabilidade das sementes é negativamente afectada quando a % de LEE é superior a 30%.

**Agradece-se a colaboração de:**

- **DGF- Centro Nacional de Sementes Florestais**
- **ANSUB- Associação dos Produtores Florestais do Vale do Sado**