

UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA

ESCOLA TÈCNICA SUPERIOR D'ENGINYERIA
AGRONÒMICA Y DEL MEDI NATURAL

Máster Universitario en Ingeniería Agronómica



Estudio para la mejora de la germinación de semillas de alcaparra (*Capparis spinosa* L.)

Trabajo Fin de Máster
Curso académico 2020-2021

AUTORA: Iris García Rodríguez
TUTORA: Nuria Pascual Seva
COTUTOR: Bernardo Pascual España

VALENCIA, JULIO DE 2021

ALUMNA: Iris García Rodríguez

TUTORA: Nuria Pascual Seva

COTUTOR: Bernardo Pascual España

TÍTULO: Estudio para la mejora de la germinación de semillas de alcaparra (*Capparis spinosa* L.)

RESUMEN: El cultivo de la alcaparra (*Capparis spinosa* L.) es un cultivo tradicional del litoral mediterráneo, ya que se trata de un ingrediente corriente en la dieta mediterránea. Sin embargo, es un cultivo que presenta problemas en su propagación, concretamente en el caso de la reproducción sexual presenta un porcentaje bajo germinación de las semillas, siendo un proceso lento. Una de las razones podría ser la cubierta dura que impide la imbibición y/o la emergencia de la radícula. En el presente Trabajo Final de Máster se evaluó la influencia de diferentes tratamientos en la imbibición, viabilidad y germinación de las semillas. Las semillas se sometieron a dos tratamientos de escarificación física, con ultrasonidos mediante un sonicador, ensayando 3 potencias y 3 duraciones diferentes, y radiación láser durante 4 tiempos de exposición diferentes. Además, se ensayó la respuesta de las semillas a la iluminación con diferentes longitudes de onda durante la germinación, analizando el efecto de iluminar las semillas con luz blanca, azul, roja, azul + roja, así como la respuesta de semillas que se mantuvieron en oscuridad. En todos los ensayos se realizaron 4 repeticiones por tratamiento, comparando siempre la humectación del sustrato con agua destilada y con una solución de ácido giberélico (500 mg L⁻¹).

En todos los ensayos se constata que para obtener una germinación adecuada se necesita la adición de ácido giberélico. El resultado obtenido con el tratamiento de ultrasonidos depende de la potencia aplicada y del tiempo de exposición, variando desde un adelanto de la germinación (20 W durante 1 min) hasta una disminución del porcentaje de germinación (100 W 3 min). Durante el tratamiento con ultrasonidos aumenta la humedad de la semilla, en mayor medida a mayor potencia y tiempo de exposición; en cambio, en el ensayo de imbibición, el contenido de humedad final de las semillas no se ve afectado por estos factores, por lo que el valor de la imbibición (%) se ve reducido a mayores potencias y tiempos de exposición. La irradiación de las semillas con rayo láser He-Ne no mejora ni adelanta la germinación; tampoco modifica el proceso de imbibición. Las semillas de alcaparra no necesitan iluminación para su germinación y la reducción del espectro de la iluminación aplicada reduce el porcentaje de germinación.

PALABRAS CLAVE:

Porcentaje de germinación - Viabilidad - Imbibición - Ultrasonidos - Rayos láser - Longitud de onda

COMPETENCIAS ORDEN CIN A LAS QUE HACE REFERENCIA EL TRABAJO:

Propagación vegetal - Fitotecnia

Valencia, julio del 2021

STUDENT: Iris García Rodríguez

ACADEMIC TUTOR: Nuria Pascual Seva

ACADEMIC COTUTOR: Bernardo Pascual España

TITLE: Study for the improvement of the germination of caper seeds (*Capparis spinosa* L.)

ABSTRACT: The cultivation of the caper (*Capparis spinosa* L.) is a traditional crop of the Mediterranean area, since it is a common ingredient in the Mediterranean diet. However, it is a crop that presents problems in its propagation, particularly it has a low seed germination percentage and has a slow germination process. One of the reasons could be the hard cover that prevents the imbibition and/or the radicle emergence. In the present Final Master's Project, the influence of different treatments on the imbibition, viability and germination of the seeds has been evaluated. The seeds were subjected to two physical scarification treatments with ultrasound using a sonicator, testing 3 powers and 3 different durations, and laser radiation during 4 different exposure times. In addition, the seeds response to different wavelengths lighting during germination were tested, analysing the effect of the white, blue, red, blue + red lights, as well as the response of seeds that were kept in the dark. In all the tests, 4 repetitions were carried out per treatment, always comparing the wetting of the substrate with distilled water and with a solution of gibberellic acid (500 mg L⁻¹).

In all the tests, it is found that to obtain adequate germination the addition of gibberellic acid is necessary. The result obtained with the ultrasound treatment depends on the applied power and the exposure time, varying from an earlier germination (20 W for 1 min) to a decrease in the germination percentage (100 W 3 min). During the treatment with ultrasound, the seed moisture increases, to a greater extent at higher power and exposure time. On the other hand, in the imbibition test, the final seed moisture content is not affected by these factors, so the imbibition value (%) is reduced at higher powers and exposure times. Irradiation of the seeds with He-Ne laser beam does not improve or advance germination; neither modifies the imbibition process. Caper seeds do not need lighting for germination, and reducing the spectrum of applied lighting reduces the germination percentage.

KEY WORDS:

Germination percentage - Viability - Imbibition - Ultrasound - Laser beams - Wavelength

COMPETENCES ORDER CIN TO WHICH THE WORK REFERS:

Plant propagation - Phytotechnics

Valencia, july 2021

ALUMNA: Iris García Rodríguez

TUTORA: Nuria Pascual Seva

COTUTOR: Bernardo Pascual España

TÍTUL: Estudi per a la millora de la germinació de llavors de tàpera (*Capparis spinosa* L.)

RESUM: El cultiu de la tàpera (*Capparis spinosa* L.) és un cultiu tradicional del litoral mediterrani, ja que es tracta d'un ingredient corrent en la dieta mediterrània. No obstant això, és un cultiu que presenta problemes a la seua propagació, concretament al cas de la reproducció sexual presenta un baix percentatge de germinació de les llavors i és un procés lent. Una de les raons podria ser la coberta dura que impedeix la imbibició i/o l'emergència de la radícula. En el present Treball Final de Màster es va avaluar la influència de diferents tractaments en la imbibició, viabilitat i germinació de les llavors. Les llavors es van sotmetre a dos tractaments d'escarificació física, amb ultrasons mitjançant un sonicador, assajant 3 potències i 3 duracions diferents, i radiació làser durant 4 temps d'exposició diferents. A més, es va assajar la resposta de les llavors a la il·luminació amb diferents longituds d'ona durant la germinació, analitzant l'efecte d'il·luminar les llavors amb llum blanca, blava, roja, blava + roja, així com la resposta de llavors que es van mantindre en fosc. En tots els assajos es van realitzar 4 repeticions per tractament, comparant sempre la humectació del substrat amb aigua destil·lada i amb una solució d'àcid giberélic (500 mg L⁻¹).

En tots els assajos es constata que per a obtindre una germinació adequada es necessita l'addició d'àcid giberélic. El resultat obtingut amb el tractament d'ultrasons depén de la potència aplicada i del temps d'exposició, variant des d'un avançament de la germinació (20 W durant 1 min) fins a una disminució del percentatge de germinació (100 W 3 min). Durant el tractament amb ultrasons augmenta la humitat de la llavor, en major mesura a major potència i temps d'exposició; en canvi, en l'assaig d'imbibició, el contingut d'humitat final de les llavors no es veu afectat per aquests factors, per la qual cosa el valor de la imbibició (%) es veu reduït a majors potències i temps d'exposició. La irradiació de les llavors amb raig làser He-Ne no millora ni avança la germinació; tampoc modifica el procés d'imbibició. Les llavors de tàpera no necessiten il·luminació per a la seua germinació i la reducció de l'espectre de la il·luminació aplicada redueix el percentatge de germinació

PARAULES CLAU:

Percentatge de germinació – Viabilitat - Imbibició - Ultrasons - Raig làser - Longitud d'ona

COMPETÈNCIES ORDRE CIN A LES QUALS FA REFERÈNCIA EL TREBALL:

Propagació vegetal - Fitotècnia

València, juliol del 2021

Quisiera agradecer a Nuria, por sus enseñanzas y su ayuda incondicional,
siempre presente cuando la necesitaba.

A Bernardo, por su dedicación y su implicación,
siempre dispuesto a ayudar.

A Laura, mi guía en el laboratorio, por esas mañanas y tardes,
trabajando codo con codo.

A mi familia y amigos
Gracias

ÍNDICE

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. EL CULTIVO DE LA ALCAPARRA.....	1
1.1.1. Descripción botánica	1
1.1.2. Importancia económica.....	2
1.1.3. Propagación de la alcaparra	3
1.2. EL USO DE LOS TRATAMIENTOS CON ULTRASONIDOS	3
1.3. EL USO DEL RAYO LÁSER	4
1.4. EL USO DE LUZ DE DIFERENTES LONGITUDES DE ONDA	5
2. OBJETIVOS	6
3. MATERIAL Y MÉTODOS	7
3.1. MATERIAL VEGETAL, ENSAYOS Y TRATAMIENTOS.....	7
3.2. ENSAYO DE IMBIBICIÓN	8
3.3. ENSAYO DE VIABILIDAD.....	8
3.4. ENSAYO DE GERMINACIÓN	10
3.5. TRATAMIENTOS CON EL PROCESADOR ULTRASÓNICO	11
3.5.1. Calibración del procesador ultrasónico.....	12
3.5.2. Tratamientos con ondas ultrasónicas	12
3.6. TRATAMIENTOS CON RADIACIÓN LÁSER HE-NE	13
3.7. ILUMINACIÓN CON DIFERENTES LONGITUDES DE ONDA	13
3.8. ANÁLISIS ESTADÍSTICO	14
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	16
4.1. TRATAMIENTOS CON EL PROCESADOR ULTRASÓNICO	16
4.1.1. Calibración del procesador ultrasónico.....	16
4.1.2. Ensayo de imbibición.....	17
4.1.3. Ensayo de germinación	23
4.2. TRATAMIENTOS CON RADIACIÓN LÁSER HE-NE	26
4.2.1. Ensayo de imbibición.....	26
4.2.2. Ensayo de germinación	29
4.3. ILUMINACIÓN CON DIFERENTES LONGITUDES DE ONDA.....	32
4.3.1. Ensayo de germinación	32
5. CONCLUSIONES	35
6. BIBLIOGRAFÍA.....	36

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. a) Flor de alcaparra y botones florales. b) Frutos de alcaparra.	1
Figura 2. Vista aérea de las parcelas de procedencia de las semillas de alcaparra utilizadas	7
Figura 3. a) Planta de alcaparra. b) Semillas de alcaparra.	7
Figura 4. a) Semillas de alcaparra sumergidas en tetrazolio. b) Cámara de germinación.	9
Figura 5. Clave de ensayo al tetrazolio.	10
Figura 6. Placa Petri preparada para el ensayo de germinación.....	11
Figura 7. Procesador ultrasónico modelo vibra cell 75115.....	12
Figura 8. a) Láser He-Ne modelo 1145. b) semilla de alcaparra irradiándose.	13
Figura 9. Iluminación con lámparas LED de diferentes longitudes de onda.	14
Figura 10. Relación de la temperatura (°C) respecto al tiempo (0-300s) tras los tratamientos con el sonicador.....	16
Figura 11. Relación entre la conductividad eléctrica (CE; $ds\ m^{-1}$) y la temperatura (T; °C) tras los tratamientos con el sonicador.	17
Figura 12. Semillas en vasos de precipitado tras los tratamientos con ultrasonidos.	17
Figura 13. Evolución de la humedad (%) de las semillas durante 8 días (tiempo en horas) tras la sonicación.....	18
Figura 14. Evolución de la imbibición (%) de las semillas durante 8 días (tiempo en horas) tras la sonicación.....	20
Figura 15. Semilla antes de realizar el ensayo con colorante azul de metileno.	21
Figura 16. Evolución de la absorción de la solución azul de metileno a lo largo de 8 días tras la sonicación.....	22
Figura 17. Curvas de germinación (%) durante 100 d antes de ajustar al modelo logístico tras la sonicación.....	24
Figura 18. Modelo logístico ajustado a la germinación acumulada correspondiente a los tratamientos con ultrasonidos.	26
Figura 19. Evolución de la humedad (%) de las semillas durante 8 días tras la irradiación.	26
Figura 20. Evolución del proceso de imbibición (%) de las semillas durante 8 días tras la irradiación.	28
Figura 21. Evolución de la absorción de la solución azul de metileno a lo largo de 8 días tras la irradiación	29
Figura 22. Curvas del porcentaje de germinación acumulada durante 100 d antes de ajustar al modelo logístico tras la irradiación	30
Figura 23. Modelo logístico ajustado a la germinación acumulada correspondiente a los valores medios de tratamientos irradiados.....	31
Figura 24. Curvas del porcentaje de germinación acumulada durante 100 d antes de ajustar al modelo logístico correspondiente a los tratameintos bajo una iluminación de diferentes longitudes de onda.....	32
Figura 25. Modelo logístico ajustado a la germinación acumulada correspondiente a los tratamientos bajo una iluminación de diferentes longitudes de onda.....	34

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Información nutricional por cada 100 g de porción comestible.	2
Tabla 2. Espectro de color de las lámparas expresado en porcentaje de longitud de onda.	14
Tabla 3. Efecto de la potencia y del tiempo del tratamiento con ultrasonidos sobre la humedad..	19
Tabla 4. Efecto de la potencia y del tiempo del tratamiento con ultrasonidos sobre la imbibición	20
Tabla 5. Efecto de la potencia (W) y la duración (min) del tratamiento con ultrasonidos en la germinación evaluando los parámetros G, A, T ₅₀ y k/2	25
Tabla 6. Efecto de la irradiación con rayos láser HE-NE sobre la humedad de las semillas en distintos tiempos del ensayo de imbibición.....	27
Tabla 7. Efecto de la irradiación con rayos láser HE-NE sobre la imbibición de las semillas en distintos tiempos del ensayo de imbibición.....	28
Tabla 8. Efecto de la irradiación con el láser HE-NE en la germinación evaluando los parámetros G, A, T ₅₀ y k/2.	31
Tabla 9. Efecto diferentes longitudes de onda en la germinación evaluando los parámetros G, A, T ₅₀ y k/2,	33

INTRODUCCIÓN

1. INTRODUCCIÓN

1.1. EL CULTIVO DE LA ALCAPARRA

1.1.1. Descripción botánica

Capparis spinosa L, conocida como “alcaparra”, “taperera” o “tapenera”, es un arbusto o mata rastrera que crece en los secanos de las provincias españolas próximas al mar Mediterráneo. También es conocida como “tapena”, “alcaparro”, “caparro”, “tápano” o “tapanera” (Luna y Pérez, 1985). Perteneció al género *Capparis*, de la familia *Capparaceae*. La designación *spinosa* se debe a las espinas que aparecen en la base de las hojas.

La alcaparra es originaria de Asia, posteriormente fue extendida por los países de las riberas del mediterráneo (Luna y Pérez, 1985). En la actualidad se cultiva en España, Italia, Francia, Grecia y el Norte de África, así como en Sudamérica (Özdemir y Öztürk, 1996; Rhizopoulou *et al.*, 2006). Se encuentra también en Turquía, sur de Portugal, Marruecos, Argelia, Grecia, Túnez y en Egipto (Tlili *et al.*, 2011). En España se encuentra en las zonas litorales de Granada, Almería, Murcia, Valencia y Baleares.

Se trata de un arbusto perenne, caducifolio, típico de secano cuyos tallos rastreros se renuevan cada año a partir de las yemas de la base, llegando a alcanzar los 3 metros de longitud en las plantas cultivadas. Las hojas son algo gruesas, de color verde y de forma más o menos oval. Los peciolo son cortos de cuya base parten apéndices transformados en espinas más o menos curvadas y de consistencia leñosa. Las flores (Figura 1.a) cuyo diámetro es de cuatro a cinco centímetros, nacen de las axilas de las hojas. Estas flores son tetrámeras con los pétalos blancos o ligeramente rosados (Luna y Pérez, 1985).

El fruto (Figura 1.b), es una baya de color verde con un largo pedúnculo, es coriáceo, y carnoso en su interior. Tiene una forma ovalada pudiendo llegar a los cuatro centímetros de longitud, según variedad y procedencia. Cuando el fruto torna algo rojizo, significa que alcanza la madurez, llegado a este estado, en la mayoría de los casos el fruto se abre, permitiendo la diseminación de las semillas. Estas son reniformes de dos a tres milímetros y adquieren un color marrón oscuro en su madurez. Respecto a la raíz, es medianamente ramificada, gruesa, fuerte y profunda, capaz de extraer agua de capas profundas de subsuelo (Luna y Pérez, 1985).

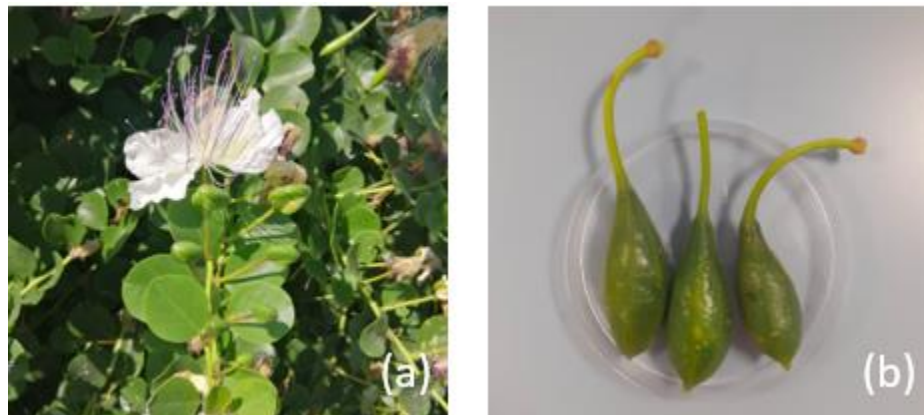


Figura 1. a) Flor de alcaparra y botones florales. b) Frutos de alcaparra.

1.1.2. Importancia económica

El principal aprovechamiento de esta planta se deriva de la recolección y venta de sus botones florales (alcaparra), que son consumidas como aperitivo o aditivo de ensaladas y en otras recetas de cocina, preparadas en salmuera, sal y vinagre. Otro uso, menos habitual, es la utilización del fruto y del tallo tierno, preparados de la misma forma que la alcaparra. Es un ingrediente corriente en la cocina mediterránea. También se utiliza como alimento para el ganado (las hojas secas), tanto de ovejas como cabras, siempre y cuando, lo tallos espinosos no impidan su ingesta (Lozano, 1977).

El componente principal de las alcaparras es el agua, seguida de las proteínas y los hidratos de carbono. Su contenido en grasas es mínimo. En este sentido, el contenido calórico de las alcaparras es bajo, por lo que se pueden utilizar para dietas hipocalóricas. Del contenido en micronutrientes, destaca el de sodio, y en mucha menor proporción el hierro (Tabla 1). En relación a las vitaminas, presenta pequeñas proporciones de vitamina E, vitamina C y riboflavina (MAPA, 2021).

Tabla 1. Información nutricional por cada 100 g de porción comestible. Fuente: MAPA,2021.

Energía (Kcal)	44
Proteínas (g)	2,4
Lípidos totales (g)	0,9
Hidratos de carbono (g)	4,9
Fibra (g)	3,2
Agua (g)	88,6
Calcio (mg)	40
Hierro (mg)	1,67
Magnesio (mg)	33
Sodio (mg)	2964
Potasio (mg)	40

El cultivo de la alcaparra ha sufrido una importante caída de producción en España desde los años 90. Esto se debe a la dificultad de su propagación, junto a la necesidad de una abundante mano de obra, a la que se le debe añadir unas condiciones laborales duras y sacrificadas en la recolección debido a su porte rastrero y, sobre todo, a causa de la competencia de precios provenientes del mercado marroquí, donde el coste de la mano de obra es mucho más bajo (Navarro, 2019).

Referente a las estadísticas de este cultivo, no se dispone de mucha información al respecto. Las estadísticas de la FAO no contemplan este cultivo. A nivel nacional, la superficie dedicada al cultivo de la alcaparra oscila entre 450 a 500 ha en los últimos 10 años, según el Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación (MAPA). Sin embargo, los datos del Ministerio habría que ponerlos en duda, ya que, a pesar de la disminución de la superficie cultivada, el cultivo aumentó casi un 500% de la producción al pasar de 87 T a 424 T, en los últimos 10 años. Este incremento no está justificado ni por un aumento de superficie ni por avances en técnicas de cultivo, por lo tanto, estos datos carecen de lógica.

1.1.3. Propagación de la alcaparra

La reproducción de la alcaparra, puede ser sexual mediante semillas o asexual, por esquejes. El presente trabajo, se va a centrar en la reproducción sexual. La reproducción por semilla comienza por la recolección de los frutos, desde finales de agosto a septiembre. Una vez recolectado, el fruto se deja secar y después, se separa las semillas de la pulpa. Una vez las semillas limpias, se colocan a la sombra unos días para que se sequen, guardándose en un sitio fresco y seco (Luna y Pérez, 1985). En ciertos estudios se ha comprobado que las mejores semillas para obtener una buena tasa de germinación son las procedentes de frutos dejados madurar en la planta y una vez abiertos, recolectarlos para la extracción de sus semillas (Pascual *et al.*, 2004).

La época de siembra más adecuada, es a la salida del invierno, siendo posible en lugares cálidos, adelantar la siembra a diciembre o enero. El nacimiento de las primeras plantas se produce entre abril y mayo. La planta empieza a dar alcaparras a partir del segundo año de vida, alcanzando en el cuarto o quinto año su máxima producción. Espontáneamente la planta produce de 2 a 3 kg de alcaparra y cuando se implanta en buena tierra de cultivo, puede producir de 6 a 8 kg de alcaparras en un año (Luna y Pérez, 1985).

La germinación de todas las semillas no se produce en el primer año, continuando la aparición de nuevas plantas en el segundo año. Tradicionalmente se ha considerado que la cubierta de las semillas es dura y poco permeable al agua (Luna y Pérez, 1985). Esta irregularidad en la germinación, se debe por un lado a una latencia física impuesta por la cubierta dura de la semilla y por otro lado a una posible latencia fisiológica (Pascual *et al.*, 2004). El letargo (latencia o dormancia) presente en las semillas de alcaparra, impide la germinación de estas, aunque haya absorbido agua y se den las condiciones propicias para germinar (Pascual *et al.*, 2017). Esta problemática, ha planteado diferentes experimentos con el fin ablandar y permeabilizar la cubierta. A lo largo de varios estudios, las semillas se han sometido a diferentes tratamientos. El equipo de investigación en el que se ha desarrollado este trabajo ha llevado a cabo diferentes estudios sobre el efecto de la escarificación química (con SO_4H_2), térmica (en seco y en agua), mecánica (con papel de lija), física (con ultrasonidos), y enzimática (con Driselasa) (Pascual *et al.*, 2004) y del remojo (Pascual *et al.*, 2009) en semillas de alcaparra.

1.2. EL USO DE LOS TRATAMIENTOS CON ULTRASONIDOS

Se llama ultrasonido a las ondas de sonido con frecuencias mayores a aquellas que pueden ser detectadas por el oído humano (Delgado, 2012). El uso de los tratamientos con procesadores ultrasónicos está cada vez más extendido, debido a su facilidad de uso, bajo coste y rapidez. Genera múltiples efectos en los tejidos vegetales, que incluye calor, efectos mecánicos como la cavitación y químicos como la inactivación de microorganismo y enzimas (Liu *et al.*, 2016).

Los efectos positivos producidos por el sonicador, se deben a la cavitación. Este proceso consiste en la formación de cavidades de vapor (burbujas) en un líquido que se producen como consecuencia de fuerzas que actúan sobre el líquido. El ultrasonido induce en el líquido cambios rápidos de presión que provocan la formación de cavidades donde la presión es relativamente baja. El colapso de las burbujas provoca un aumento de temperatura y la diferencia de presión, que puede tener consecuencias mecánicas sobre las estructuras celulares. Por ejemplo, si las burbujas colapsan cerca de la cubierta de la semilla, pueden dañar la superficie y crear poros, lo que podría producir una mejora en la absorción de agua y oxígeno, y, en consecuencia, una mejora en la germinación (López y Vicient, 2017).

Se ha demostrado que su uso produce efectos positivos en la germinación de las semillas de diversas especies, como por ejemplo en semillas envejecidas de *Arabidopsis thaliana* (López y Vicient, 2017) y es capaz de romper la latencia en malezas como *Chenopodium álbum* L. (Babaei *et al.*, 2020). También se ha demostrado su eficacia en cultivos comerciales, tales como brócoli (*Brassica oleracea*), alfalfa (*Medicago sativa*) y soja (*Glycine max*), donde al aumentar el tiempo de tratamiento, aumentó el porcentaje de germinación (Kim *et al.*, 2006 y Porto *et al.*, 2018).

Recientemente, también se utilizan tratamientos con ultrasonidos en la agroindustria, gracias a sus buenos resultados. Las principales aplicaciones consisten en la utilización de ultrasonidos para la inactivación enzimática, filtración, emulsificación, desgasificación de líquidos y homogenización (Delgado, 2012). En el cultivo del arroz (*Oryza sativa*), los tratamientos mejoraron la hidrólisis del almidón, aumentando el contenido en glucosa (Ding *et al.*, 2018). La tecnología de ultrasonidos también se utiliza en procesos de hidratación de granos. Se ha estudiado el uso de ultrasonidos como tratamiento previo al remojo de los garbanzos (*Cicer arietinum* L.), demostrando que la tasa de absorción de agua del garbanzo, aumentó a medida que aumentaba la temperatura, el tiempo y la potencia del ultrasonido (Mehmet *et al.*, 2010; Ranjbari *et al.*, 2013). Del mismo modo ocurre con el cultivo del sorgo (*Sorghum spp*; Patero y Augusto, 2015) y con el cultivo de la judía blanca (*Phaseolus vulgaris*; Ghaffoor *et al.*, 2014). En todos los casos, el tiempo de remojo necesario se ve reducido. Previamente a este estudio, Pascual *et al.* (2004) obtuvieron resultados positivos en la germinación de semillas de alcaparra con la utilización de un baño de ultrasonidos.

1.3. EL USO DEL RAYO LÁSER

La palabra láser proviene del inglés “Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation” que significa amplificación de la luz por emisión estimulada de radiación. El láser es un dispositivo que produce luz monocromática. Gracias al pequeño diámetro de luz de la línea de emisión, la radiación láser se puede enfocar de manera muy nítida en un área muy pequeña, lo que da como resultado una alta densidad de energía en la superficie (Hoffmann, 1996 citado por Krawiec *et al.*, 2018).

La longitud de onda emitida por el láser, corresponde a la luz roja que, junto con el rojo lejano, es responsable de la activación del fitocromo, importante en la fisiología vegetal. Los cambios en el contenido de formas de fitocromo (Pr y Pfr) regulan importantes procesos de la vida de las plantas, como, por ejemplo, la germinación de las semillas (Brutnell, 2006, citado por Krawiec *et al.*, 2018). La radiación láser de He-Ne provoca la inducción del fitocromo, que mejora las actividades enzimáticas y, por tanto, aumenta la entropía y energía interna de la semilla durante la germinación. También se relaciona con una aceleración de la división celular y del crecimiento de las plantas (Krawiec *et al.*, 2018).

Por otro lado, los efectos positivos asociados a los tratamientos de las semillas con rayos láser, pueden deberse a perforaciones en las cubiertas de las mismas provocados por los rayos láser. Estudios como los de Krawiec *et al.* (2018) demuestran que la irradiación con rayo láser produce un aumento del porcentaje y de la velocidad de germinación.

En los últimos años, el uso de los rayos láser se ha utilizado como alternativa viable para incrementar los rendimientos y la calidad de las cosechas. Los tratamientos de las semillas con láser se han utilizado en cultivos comerciales como lentejas (*Lens culinaris*) y trigo (*Triticum aestivum* L.; AL-Quraan *et al.*, 2020). Se ha demostrado en cultivos como el tomate (*Solanum lycopersicum* L.) que los tratamientos con láser mejoran tanto el rendimiento como la altura de las plantas, la longitud de la raíz y el diámetro del tallo (Ramírez, 2006 y Álvarez, 2011).

Del mismo modo, los tratamientos con rayos láser, también influyen positivamente en la germinación de las semillas. En cultivos secundarios como Kudzú (*Pueraria phaseoloides*; González, 2008) y la escorzonera (*Scorzonera hispanica* L.; Krawiec *et al.*, 2016), las semillas tratadas con rayos láser han mostrado un incremento en el porcentaje de germinación.

Previamente a este estudio, se realizaron diferentes experimentos en alcaparra con el fin de superar esta posible latencia física presente en las semillas. Concretamente, Juan (2017) evaluó la influencia del láser He-Ne en semillas de alcaparra, siguiendo en este Trabajo Fin de Máster, esa misma línea de estudio.

1.4. EL USO DE LUZ DE DIFERENTES LONGITUDES DE ONDA

La radiación solar es un factor determinante en el desarrollo de la vida en el planeta Tierra. La luz además de ser una fuente indispensable de energía para la fotosíntesis de las plantas, es también un factor importante para su crecimiento y desarrollo (Ding *et al.*, 2010). La existencia de la atmósfera, permite a los seres vivos exponerse a diferentes intensidades y longitudes de onda de radiación solar. Las plantas, al ser seres inmóviles, no pueden huir de ciertas situaciones provocadas por la radiación. Por ello, han desarrollado mecanismos mediante los fotorreceptores capaces de generar respuestas celulares que se traducen, en procesos fisiológicos al detectar una longitud de onda determinada. Los fitocromos son capaces de detectar radiación en el rango rojo/rojo lejano (600-750 nm) y los fotorreceptores de la familia de los criptocromos y fototropinas son capaces de detectar la radiación en el rango UV-A/azul (320-500 nm; Meisel *et al.*, 2011).

La luz roja con una longitud de onda de 610 a 720 nm y la luz azul con una longitud de onda de 400 a 510 nm son los principales espectros que estimulan el crecimiento de las plantas (Pepper *et al.*, 2001). La luz roja estimula la germinación de las semillas, la elongación celular e interviene en el proceso de la morfogénesis (diferenciación de órganos). En cambio, la luz azul estimula procesos como el fototropismo (regula el crecimiento celular, lo que le permite crecer en función o dirección de la fuente luminosa) y la morfogénesis, así como en la reorientación de cloroplastos intracelularmente, en la apertura de las estomas y en la síntesis de clorofila (Meisel *et al.*, 2011).

Recientemente la luz LED (*light emitting diode*) se ha convertido en una alternativa para el cultivo de plantas por muchas ventajas. Entre ellas, destaca su pequeño tamaño, su larga vida útil, la temperatura de emisión fría y la opción de seleccionar longitudes de onda específicas. Además, destaca su eficiencia en la conversión de energía. Por ello, se ha utilizado como parte de un posible sistema vital en marte (Meisel *et al.*, 2011) o en cultivos verticales para dar solución a la escasez de suelo de cultivo (Canali *et al.*, 2018).

A finales del siglo XX, se comenzó a estudiar los efectos de la iluminación LED en lechuga (Bula *et al.*, 1991) continuando esta línea de estudio hasta la actualidad. Se ha estudiado tanto la influencia de una única longitud de onda como la combinación de dos o más, habitualmente se realizan experimentos de luz roja con luz azul suplementaria. Se ha llevado a cabo experimentos en cultivos como en arroz (Matsuda, 2004.), en brócoli (Paniagua *et al.*, 2015), en pimiento (*Capsicum annuum*; Brown *et al.*, 1995) y trigo (Goins *et al.*, 1997), donde la combinación de rojo con azul o rojo lejano, mostró mejores resultados en la producción de biomasa vegetal.

Respecto a estudios previos en alcaparras, por el momento no consta que se haya estudiado la germinación y posterior crecimiento de las plántulas de alcaparra bajo luces de diferentes longitudes de onda. En el presente Trabajo Fin de Máster, se va a estudiar la influencia de diferentes longitudes de onda en la germinación de semillas de alcaparra.

OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

Los objetivos de este trabajo son los siguientes:

- Estudiar la influencia de los tratamientos con ultrasonidos en la germinación e imbibición de las semillas de *C. spinosa* L.
- Estudiar la influencia de la radiación láser He-Ne sobre la germinación e imbibición de las semillas de *C. spinosa* L.
- Estudiar el efecto de la luz tipo LED de alta intensidad con distinta longitud de onda (rojo, azul y la combinación de ambas) en la germinación de las semillas *C. spinosa* L.

MATERIAL Y MÉTODOS

3. MATERIAL Y MÉTODOS

3.1. MATERIAL VEGETAL, ENSAYOS Y TRATAMIENTOS

El estudio se realizó en el laboratorio de Fitotecnia General del Departamento de Producción Vegetal de la Escuela Técnica Superior de Ingeniería Agronómica y del Medio Natural, en la Universitat Politècnica de València.

Las semillas de alcaparra utilizadas en el estudio procedían de dos parcelas situadas en el término municipal de Lliria, provincia de Valencia. La primera parcela (Figura 2.a) se localiza en el polígono 142, parcela 281. Las plantas de alcaparra (Figura 3.a) se encuentran en el borde norte de la parcela cuyo cultivo principal son cítricos. La segunda parcela (Figura 2.b) se ubica en el polígono 184, parcela 56. Las plantas de alcaparra se encuentran en el borde oeste de la parcela, cuyo cultivo principal son olivos.

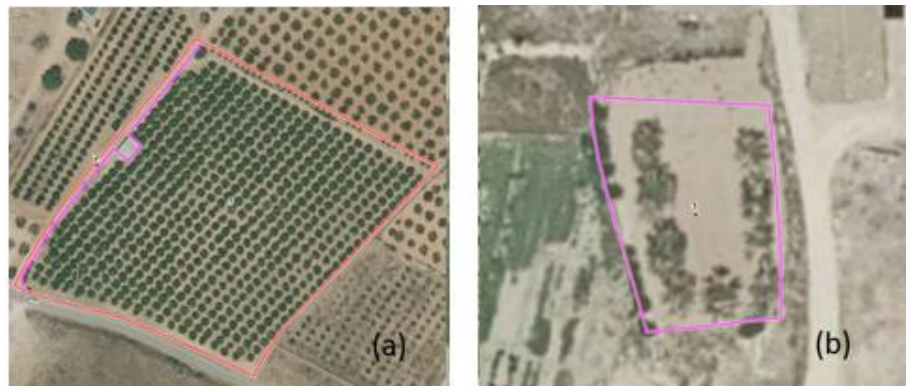


Figura 2. Vista aérea de las parcelas de procedencia de las semillas de alcaparra utilizadas.

La recolección de las semillas, tuvo lugar durante la primera quincena de septiembre de 2020. Se recolectaron las semillas (Figura 3.b) de frutos maduros y cerrados. Las semillas fueron extraídas del fruto eliminándose los restos de pulpa mediante frotación y lavado. Las semillas inmaduras se separaron por decantación. Para evitar futuras infecciones, se desinfectaron las semillas con una solución de $9,25 \text{ g L}^{-1}$ de cloro activo durante 2 min, seguidos de varios lavados con agua destilada. Las semillas se secaron y se almacenaron en condiciones de laboratorio hasta el mes de marzo 2021, cuando se realizaron los diferentes tratamientos.



Figura 3. a) Planta de alcaparra. b) Semillas de alcaparra.

El estudio abarca tres experimentos en los que analiza el efecto de los tratamientos con ultrasonidos, radiación láser e iluminación con lámparas de diferente longitud de onda, en la imbibición, viabilidad y germinación de las semillas de alcaparra. A continuación, se presentan los tres ensayos (imbibición, viabilidad y germinación) realizados tras la realización de cada uno de los tres tratamientos (con ultrasonidos, radiación láser e iluminación con lámparas de diferente longitud de onda) a las semillas.

3.2. ENSAYO DE IMBIBICIÓN

El ensayo se realizó siguiendo la metodología presentada por Ma *et al.* (2004), y Juan (2017). Primero se pesaron las semillas y posteriormente se pusieron a remojo en tubos de ensayo de vidrio, con una columna de 1 cm de agua destilada (Juan, 2017). Se realizaron mediciones cada 2 h durante las primeras 8 h de imbibición, y luego cada 24 h durante 8 d. Las semillas se secaron superficialmente de manera previa al realizar cada pesada. Se utilizó una balanza analítica (Sartorius, modelo B 120S) con una resolución de 0,1 mg. Finalmente, para el cálculo de la humedad, las semillas se secaron en estufa de aire forzado (Selecta 297) a 103 °C durante 48 h y se volvieron a pesar. Se realizaron 4 repeticiones por tratamiento, de 10 semillas cada una.

Los valores de la imbibición se presentan en porcentaje de absorción de agua, expresada como incremento de peso fresco (%) en cada período (i) respecto al peso fresco inicial de la semilla (Orozco-Segovia *et al.*, 2007).

$$\text{Imbibición (\%)} = \frac{\text{Peso fresco}_i - \text{Peso fresco}_{\text{inicial}}}{\text{Peso fresco}_{\text{inicial}}} \times 100$$

Así mismo, se calculó el contenido en humedad, mostrándose estos valores también en porcentaje, calculado como el contenido de agua de la semilla respecto al peso seco (ISTA, 2016).

$$\text{Humedad (\%)} = \frac{\text{Peso fresco} - \text{Peso seco}}{\text{Peso fresco}} \times 100$$

Dado que el agua es incolora, el proceso de imbibición no se detecta visualmente, por lo que, con el objetivo de conocer el lugar por donde absorben el agua las semillas y cómo se expande por el interior de las mismas, paralelamente, se realizó un ensayo de coloración con azul de metileno puro (Scharlau). Este ensayo se realizó tras los tratamientos de ultrasonidos y rayos láser para comprobar si éstos alteraban el proceso de humectación de las semillas; al igual que en el ensayo de imbibición con agua, en la imbibición con colorante se realizaron 4 repeticiones por tratamiento, de 120 semillas (12 periodos con 10 semillas en cada uno). Para ello, se pusieron las semillas en remojo con 5 ml de colorante en tubos de ensayo. Se dejaron embebiendo durante los mismos tiempos que en el ensayo de imbibición con agua, y tras cada período de tiempo se cortaron 10 semillas por tratamiento y se observó el ingreso del colorante en el interior de las mismas. Las observaciones se realizaron mediante una lupa (U500X microscopio digital; Cooling Tech).

3.3. ENSAYO DE VIABILIDAD

La determinación de la viabilidad de las semillas se realizó con el objetivo de profundizar en la interpretación del ensayo de germinación, y consecuentemente facilitar y acortar los ensayos futuros. Se ha determinado la viabilidad de las semillas tras la realización de cada tratamiento, así

como en semillas control. Para la realización de la viabilidad, se hicieron 4 repeticiones de 10 semillas cada una, para cada tratamiento.

La metodología seguida ha sido la indicada en el Manual de ensayos del Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación (Moore, 1985) y en el manual publicado de las Reglas Internacionales para Análisis de Semillas (ISTA, 2016), utilizando una solución al 1% de tetrazolio (Tetrazolium Red. 2,3,5-Triphenyltetrazolium chloride; Sigma-Aldrich). Se disolvió 1 g del producto comercial en 100 ml de agua destilada. Se utilizaron tubos de ensayo de vidrio en los que se introdujo las semillas y la solución de tetrazolio (Figura 4.a). Previamente, se realizó una punción a cada semilla con la ayuda de una aguja de disección y unas pinzas, con el fin de facilitar la entrada del reactivo en la semilla y la evaluación. La incisión se realizó en la parte opuesta al hilo de la cubierta seminal. Las semillas, inmersas en la solución de tetrazolio, se mantuvieron durante 48 h, a 30 °C, en oscuridad, en la cámara de germinación (Figura 4.b), produciéndose la tinción tras la imbibición.

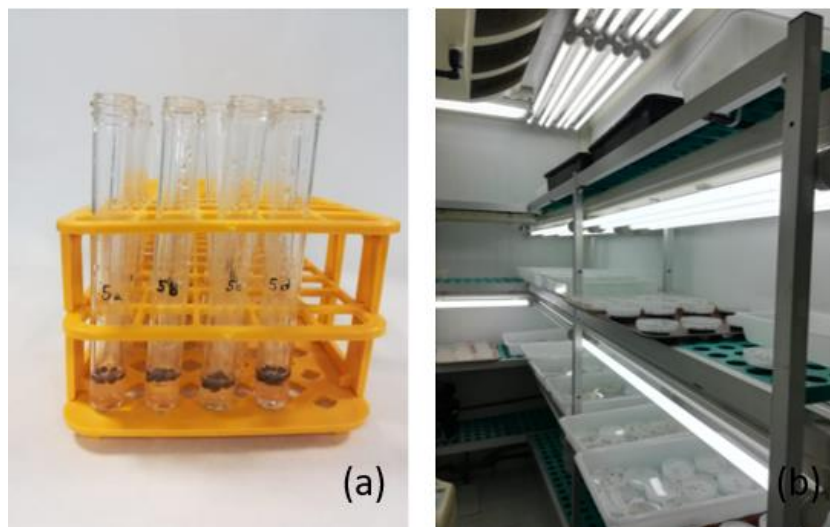


Figura 4. a) Semillas de alcaparra sumergidas en tetrazolio. b) Cámara de germinación.

Una vez transcurridas las 48 h, se cortaron las semillas por la mitad con la ayuda de una pinza y un bisturí. Cada semilla se fotografió y se clasificó según el criterio fijado por el Manual de ensayos del Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación (Moore,1985). Este Manual establece cuatro categorías: sano; débil, pero viable; débil, pero no viable; y muerto.

-Tejidos sanos (A): tienden a teñirse gradual y uniformemente desde las superficies externas hacia el interior. Los cambios en la intensidad de color son graduales y sin límites nítidos. Dentro de los tejidos el color rojo es brillante y lustroso, especialmente si no está excesivamente teñidos. Las superficies cortadas se tiñen más fácilmente que los tejidos con las membranas intactas. Los tejidos internos, en el que el color no ha tenido tiempo de formarse, tienden a ser de color rosado-amarillo o amarillento-blanco (Figura 5.A).

-Tejidos débiles y viables (B): fluctúan en grados de deterioro desde los casi totalmente sanos hasta un límite más o menos nítido, con tejidos teñidos débiles y no-viables, o con tejidos muertos y no-teñidos. La tinción y las características del tejido varían también con la naturaleza y extensión del deterioro. La intensidad del color anormal se incrementa gradualmente con el aumento del grado de deterioro (Figura 5.B).

-Tejidos débiles y no viables (C): pueden incluir un embrión completo, o pueden estar rodeados de tejidos viables sanos y/o débiles. El color puede ser rojo purpúreo, parduzco o grisáceo y puede variar en intensidad desde el rojo anormalmente oscuro a rojo pálido o rosáceo. Las superficies de corte por el eje del embrión realizadas previamente a la tinción pueden aparecer blanquecinas, mientras que los tejidos interiores pueden aparecer rojo oscuro. No siempre existe un límite nítido entre los tejidos anormalmente teñidos no-viables y los tejidos no-teñidos no-vivos. Ambos tipos de tejidos se consideran muertos, independientemente de las diferencias de color (Figura 5.C).

-Tejidos no teñidos, muertos (D): los tejidos muertos generalmente son flácidos, borrosos, con aspecto de tiza blanco, grisáceos-blancos y sin brillo. Los tejidos muertos adyacentes a los tejidos viables, generalmente están separados por un límite nítido (Figura 5.D).

Para la evaluación de la viabilidad de las semillas de alcaparra se ha seguido la clave propuesta por Juan (2017) siguiendo los criterios del MAPA (Moore, 1985), que discrimina las semillas según en función de las categorías de los tejidos.

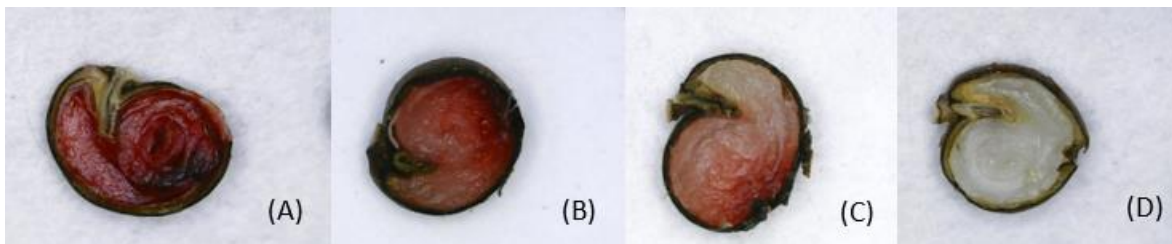


Figura 5. Clave de ensayo al tetrazolio: (A) tejido sano, (B) tejido débil y viable, (C) tejido débil y no viable, (D) tejido muerto.

3.4. ENSAYO DE GERMINACIÓN

Para la realización del ensayo de germinación se utilizó el método BP (Between Paper) que establece las Reglas Internacionales para Análisis de Semillas (ISTA, 2016). Consiste en utilizar papel de filtro como sustrato, depositando las semillas entre dos papeles de filtro. El papel de filtro era de grosor medio (73 g m^{-2}) y fue previamente esterilizado en autoclave. Los papeles de filtro fueron humedecidos periódicamente, con una solución de ácido giberélico (AG_3) a la concentración de 500 mg L^{-1} (Ácido giberélico 1,6% p/v, Semefil, del laboratorio Nufarm) o con agua destilada en las semillas control.

Se realizaron 4 repeticiones por tratamiento, cada una de ellas compuesta por 50 semillas, distribuidas uniformemente para evitar el contacto de unas con otras (Figura 6). Se utilizaron placas de Petri de 9 cm de diámetro, selladas con Parafilm para mantener húmedo el papel de filtro. Previamente a los tratamientos, se desinfectaron las semillas en una solución de $9,25 \text{ g L}^{-1}$ de cloro activo, realizándose posteriormente dos lavados con agua destilada.

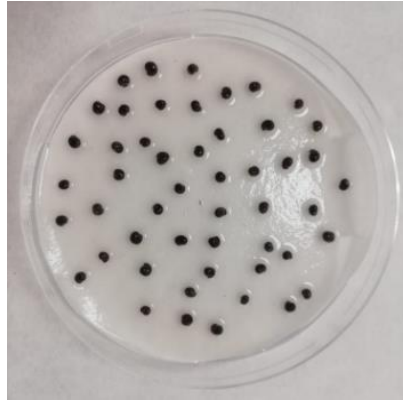


Figura 6. Placa Petri preparada para el ensayo de germinación.

Las semillas se mantuvieron durante 3 meses en el interior de una cámara de germinación (Climatronic), a la temperatura de 30°C durante el día y 20°C durante la noche, con un fotoperiodo de 12 h y una humedad relativa constante de 85%. La iluminación consistía en tubos fluorescentes blancos fríos, proporcionando un total de 4000 lux a la cámara.

Las semillas germinadas se contaron dos veces por semana, extrayendo las germinadas de las placas de Petri. Las semillas se consideraban germinadas cuando presentaban la radícula visible (de 1 mm).

Respecto a la validez del ensayo de germinación, se consideraron aceptables aquellos ensayos donde la diferencia de los porcentajes de germinación máximos y mínimos entre las 4 repeticiones no superaron el umbral establecido, dependiente del propio valor del porcentaje de germinación obtenido (ISTA, 2016); en caso contrario, el ensayo no se consideraría como válido y debería repetirse. En este estudio, no fue necesario la repetición de ningún ensayo.

3.5. TRATAMIENTOS CON EL PROCESADOR ULTRASÓNICO

En este experimento se ha utilizado un procesador ultrasónico (sonicador) Bioblock, modelo vibra cell 75115, con sonda CV334 (Figura 7). Este sonicador trabaja con una frecuencia de 20 kHz y una potencia máxima de 500 W, siendo posible variar la amplitud desde 0-100%.



Figura 7. Procesador ultrasónico modelo vibra cell 75115.

3.5.1. Calibración del procesador ultrasónico

Previamente a los tratamientos con el sonicador, se realizó la calibración del mismo. Para el calibrado, se probaron diferentes amplitudes durante diferentes tiempos. Concretamente, se seleccionaron las amplitudes de 25, 50 y 75% durante 0 (control), 30, 60, 120, 300 y 600 s. La calibración se llevó a cabo con el fin de determinar la potencia a la que trabaja cada amplitud, y al mismo tiempo, que sirviera de soporte para decidir las combinaciones de amplitud de la onda y tiempo de tratamiento a ensayar inicialmente, en función de las temperaturas alcanzadas con las respectivas combinaciones.

Para la calibración, se utilizaron vasos de precipitados de vidrio de 100 ml con 80 ml de agua destilada. Se midió la temperatura y se anotó la energía registrada por el ultrasonido con la que se calcularía posteriormente la potencia.

3.5.2. Tratamientos con ondas ultrasónicas

En base a los resultados de la calibración se decidió realizar los tratamientos correspondientes a las siguientes combinaciones: amplitudes de 25, 50, 75% durante 0 (control), 60, 120 y 180 s.

Tras los tratamientos con ultrasonidos, se realizaron los ensayos de imbibición, viabilidad y germinación, con 4 repeticiones por tratamiento en cada ensayo, por lo que en cada tratamiento con ondas ultrasónicas se utilizaron 600 semillas [160 semillas para el ensayo de imbibición (40 con agua y 120 con solución de azul de metileno), 40 semillas para el ensayo de viabilidad, y 400 semillas para el ensayo de germinación (200 para humedecer el sustrato con AG_3 y 200 para humedecer el sustrato con agua destilada)].

Inmediatamente después de la realización de los tratamientos para el ensayo de germinación, se midió la temperatura y la conductividad eléctrica del agua destilada mediante un conductímetro de mano (EUTECH).

3.6. TRATAMIENTOS CON RADIACIÓN LÁSER HE-NE

Las semillas fueron irradiadas con un láser (Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation) de He-Ne (Helio-Neón) JDS Uniphase 1145 (Figura 8). La potencia de emisión de salida es de 22,5 mW, y la longitud de onda es de 632,8 nm (banda roja del espectro), con un haz circular 0,7 mm de diámetro y con una densidad de potencia de 58,47 mW mm⁻².

Previamente a los tratamientos de láser, se realizaron pruebas con diferentes tiempos para comprobar la viabilidad de las semillas tras estos tratamientos. Se irradiaron 40 semillas por tratamiento, con una potencia de 22,5 mW durante 0 (control), 1, 5, 15, 30, 60, 120, 180 y 360 s.

Una vez realizada la viabilidad, se decidió trabajar con los siguientes tiempos: 0 (control), 1, 15, 60 y 180 s. Los tratamientos se realizaron semilla por semilla, ya que el láser tenía un haz circular muy pequeño (0,7 mm de diámetro), prácticamente coincidente con las dimensiones de las semillas. Tras la irradiación, se realizó el ensayo de imbibición y de germinación explicado anteriormente, con 4 repeticiones de 50 semillas, utilizando tanto agua destilada como la solución de AG₃ para humedecer el sustrato.

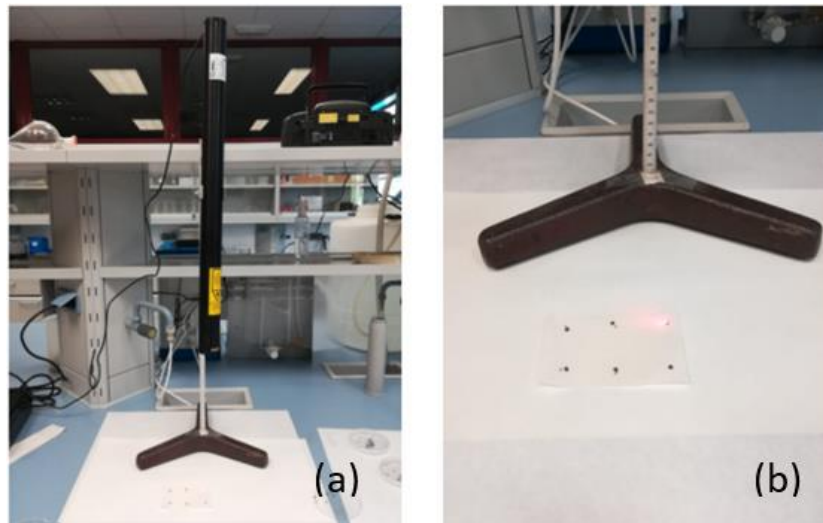


Figura 8. a) Láser He-Ne modelo 1145. b) semilla de alcaparra irradiándose.

3.7. ILUMINACIÓN CON DIFERENTES LONGITUDES DE ONDA

Para el siguiente ensayo las semillas se pusieron a germinar en condiciones de luz y oscuridad. Se ensayó la germinación con iluminación mediante luces de colores (rojas y azules) y blancas. La iluminación de color se consiguió con luces de diodo emisor de luz (light-emitting diode; LED) marca AMZLAB GmbH, consistentes en 80 LEDs (52 rojos, que emiten en el rango de longitudes de onda 600-700 nm, y 28 azules, que emiten en el rango de longitudes de onda 400-500 nm); la potencia máxima cuando se utiliza el espectro completo de luces es de 30 W. La iluminación blanca fue proporcionada por tubos fluorescentes (Philips TL - D 36 W / Código de color 54-765) con una potencia de 36 W, una distribución del espectro de color que varía entre longitudes de onda de 300 a 800 nm y con una radiación fotosintéticamente activa de 81,1 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, medida con el radiómetro.

Las placas de Petri conteniendo las semillas y el sustrato se dispusieron en el interior de unas cajas opacas y cerradas, que impedían tanto la entrada como la salida de luz. Se ensayaron cuatro tipos de luz (Figura 9): roja (52 LEDs rojos; $102,5 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$), azul (28 LEDs azules; $80,1 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$), rojo + azul (52 LEDs rojos + 28 LEDs azules; $\mu\text{mol } 125,4 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) y blanca (tubos fluorescentes blancos fríos; 4000 luxes), proporcionando una alta relación Radiación roja/Radiación roja lejana (R/RL). Se realizaron 4 repeticiones (de 50 semillas) por tratamiento, humectando el sustrato con AG_3 y con agua.

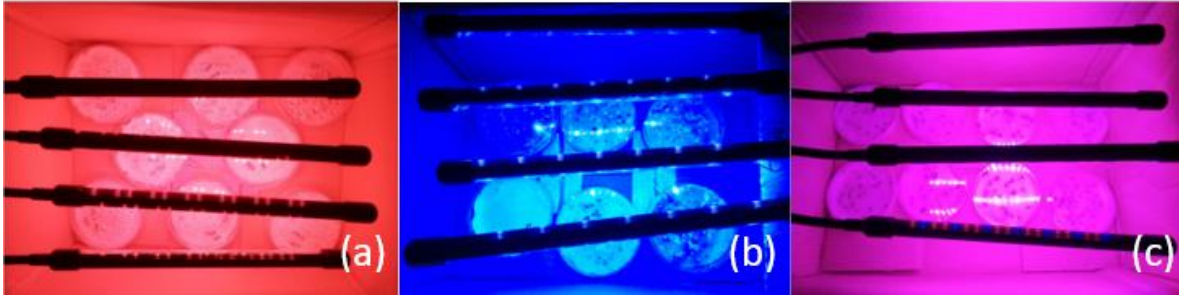


Figura 9. Iluminación con lámparas LED de diferentes longitudes de onda. a) rojo. b) azul. c) combinación rojo y azul.

Los espectros de color de los tubos fluorescentes blancos y de las diferentes lámparas, se obtuvieron mediante un espectrómetro Thorlabs, modelo CCS200/M, y se muestran en el Anexo 1. Se calcularon los porcentajes de cada tipo de longitud de onda en cada lámpara, mediante el programa ImageJ. Para ello, se midieron las áreas comprendidas entre los rangos deseados de las longitudes de onda del espectro de color, calculándose así los porcentajes (Tabla 2).

Tabla 2. Espectro de color de las lámparas utilizadas expresado en porcentaje de longitud de onda.

Longitud de onda (nm)	Tubo fluorescente			
	blanco	LED Azul	LED Rojo	LED Rojo+Azul
Violeta 300-400	1,51%	0,00%	0,00%	0,00%
Azul 400-500	30,33%	97,48%	2,98%	30,25%
Verde 500-600	43,32%	1,05%	7,88%	5,27%
Rojo 600-700	22,27%	1,47%	80,55%	58,41%
Rojo-lejano 700-800	2,56%	0,00%	8,58%	6,06%
R/RL	8,69	0,00	9,39	9,63

3.8. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Para la realización del análisis estadístico se utilizó el programa STATGRAPHICS Centurion XVI. Las curvas de germinación se ajustaron a la función logística (Torres y Frutos, 1990), cuya validez para la germinación de las semillas de alcaparra fue demostrada previamente (Pascual *et al*, 2004).

La función logística tiene la siguiente expresión:

$$G=A [1 + \exp (\beta -kt)]^{-1}$$

Donde:

G: Germinación acumulada (%)

A: Máximo porcentaje de germinación (%)

β : Parámetro referente a la posición de la curva en relación con el eje del tiempo.

K: Parámetro de velocidad

t: Periodo de germinación (días)

A partir de los resultados, se calcularon los parámetros con significado biológico: el número de días necesarios para alcanzar el 50% del porcentaje de germinación final (T_{50} d), que coincide con el punto de inflexión de la curva sigmoidea. También se calculó la velocidad media relativa de germinación acumulada ($k/2$, d^{-1}).

Se han analizado los resultados mediante el análisis multifactorial de la varianza (ANOVA), realizando la separación de medias mediante el test LSD ($p \leq 0,05$) cuando el efecto resultó significativo ($p \leq 0,05$) en el ANOVA. Previamente se comprobó que las series de datos siguiesen una distribución normal, y aquellos datos que se presentaban en porcentaje, se transformaron mediante la expresión: $\text{arc sen } \sqrt{x}$.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. TRATAMIENTOS CON EL PROCESADOR ULTRASÓNICO

4.1.1. Calibración del procesador ultrasónico

Durante el ensayo de calibración, se determinó la energía generada por el sonicador aplicando diferentes amplitudes. Los resultados de las potencias (W) calculadas para las amplitudes de 25, 50 y 75% son de 20, 50 y 100 W, respectivamente.

Al mismo tiempo, se midieron las temperaturas tras diferentes periodos de tiempo. Como se muestra en la Figura 10, se partió de una temperatura ambiente de aproximadamente 20°C, alcanzando temperaturas de más de 80°C, cuando el tiempo y la amplitud eran máximos (amplitud 75% durante 300 s). Dado que las temperaturas tan altas pueden afectar negativamente a las semillas, se decidió realizar los tratamientos con las tres amplitudes durante 0 (control), 60, 120 y 180 s. De esta forma no se superaban los 65°C con la mayor amplitud (amplitud 75%).

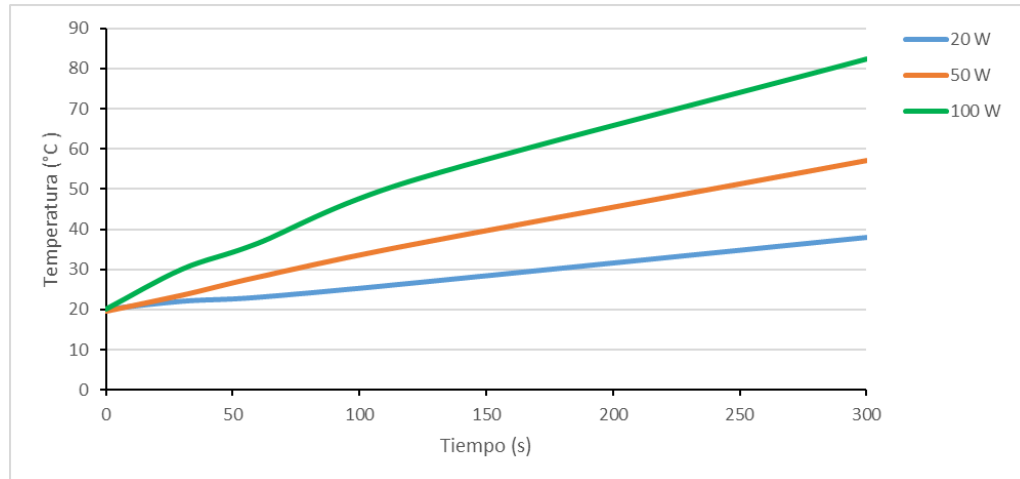


Figura 10. Relación de la temperatura (°C) respecto al tiempo (0-300s) tras los tratamientos con el sonicador utilizando diferentes potencias (20-50 -100 W).

Estos rangos de potencias también se han utilizado en otros experimentos con semillas; en un estudio sobre la hidratación del garbanzo, donde se utilizó un sonicador de 25 kHz que proporcionaba una potencia de 100 y 300 W (Mehmet *et al.*, 2010). Ranjbari *et al.* (2013) seleccionaron las amplitudes de onda de 40%, 70%, 100% a 24 kHz, y densidad de potencia máxima de 600 W.

Tras el ensayo de viabilidad realizado después de la calibración del sonicador, resultó menor ($P \leq 0,05$) la viabilidad de las semillas tratadas durante 300 s con amplitudes de 25 y 50%, respecto al control. Debido a las ya comentadas altas temperaturas alcanzadas cuando se aplicaba ultrasonidos durante 300 s y la baja viabilidad que mostró tras el ensayo del tetrazolio, se decidió descartar los 300 s del ensayo de germinación.

En la Figura 11 se aprecia cómo la conductividad eléctrica (CE) aumenta, al aumentar la temperatura. Como ya se ha visto en la Figura 10, la temperatura aumentó a mayor potencia y tiempo de aplicación. El aumento de la CE se podría deber al desprendimiento de fragmentos de

cubierta durante los tratamientos, lo que probablemente es la causa de la tonalidad marrón que adquiere el agua, cada vez más oscuro a medida que aumenta la potencia del sonicador (Figura 12).

Estos valores obtenidos, coinciden con los obtenidos por el estudio publicado por Ranjbari *et al.* (2013), ya que, tras los tratamientos con el sonicador, el valor de CE aumentó significativamente cuando aumentó la temperatura de remojo, la cual aumentó al aumentar la potencia del sonicador.

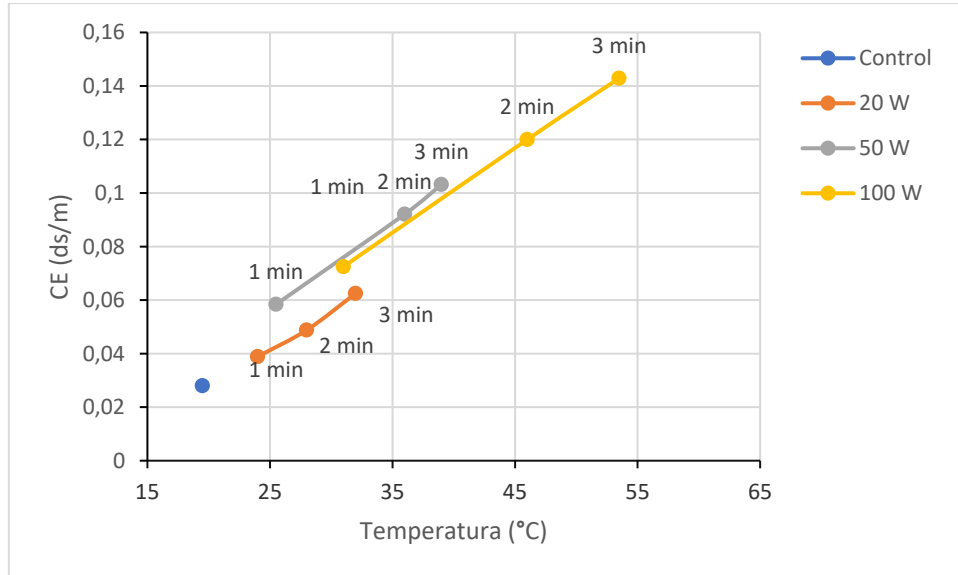


Figura 11. Relación entre la conductividad eléctrica (CE; ds m^{-1}) y la temperatura (T; $^{\circ}\text{C}$) tras los tratamientos con el sonicador a diferentes potencias (20, 50 y 100 W) y durante tres periodos de tiempo (60,120 y 180 s).

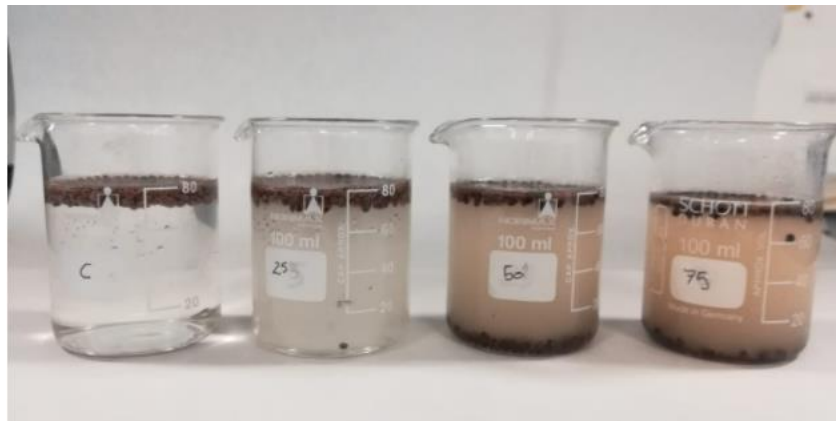


Figura 12. Semillas en vasos de precipitado tras los tratamientos con ultrasonidos (0, 20, 50 y 100 W de potencia durante un minuto).

4.1.2. Ensayo de imbibición

Tal y como se observa en la Figura 13 y tras realizar el análisis estadístico ANOVA (Tabla 3) pertinente, en las primeras 24 h, se puede ver como el factor potencia afecta significativamente ($P \leq 0,01$) al porcentaje de humedad.

Dado que las semillas fueron tratadas con ultrasonidos mientras estaban sumergidas en agua, se ha analizado el momento 0 h, es decir, justo en el momento que salen del sonicador. Por

ello, los valores iniciales de humedad no son homogéneos, siendo de partida la humedad del lote 8,6%. Las semillas tratadas con potencias más altas (50 y 100 W), presentan mayor valor de humedad, seguidas por las semillas tratadas con una potencia de 20 W y finalmente con un valor menor de humedad, se encuentran las semillas control. Esto se puede deber al efecto de la cavitación, provocando una alteración de las cubiertas (en sentido amplio) y favoreciendo la entrada de agua en la semilla.

A las 8 h, el contenido de humedad de las semillas control alcanza valores de porcentaje de humedad similares al de las semillas tratadas con una potencia de 20 W, sin llegar a alcanzar a los otros dos tratamientos que muestran valores más altos. A las 24 h, los valores de humedad de las semillas tratadas con las potencias más altas, se estabilizan. A partir de las 48h, todos los tratamientos se estabilizaron con valores de humedad sin diferencias estadísticas ($P \leq 0,05$) entre ellos. Los valores más altos alcanzados fueron entre un rango de 31,2-31,5% de humedad, independientemente de las potencias y tiempos aplicados.

Los resultados coinciden con los obtenidos en estudios anteriores realizados en semillas comerciales por el equipo de investigación. En semillas cuyas cubiertas estaban dañadas (con distintos grados de raspaduras, grietas y roturas), su contenido en humedad aumentó rápidamente en las primeras 24 h y se estabilizaron, sin embargo, las semillas intactas continuaron absorbiendo agua lentamente hasta las 96 h (Foschi *et al.*, 2020). Estos resultados también coinciden con lo obtenido por Juan (2017) quien indica que el tiempo necesario para la estabilización de la humedad de las semillas de alcaparra depende de las características propias del lote, oscilando entre 24 y 96 h.

Estos resultados demuestran que la absorción de agua en las etapas iniciales (las primeras 24 h), se incrementa con la sonicación y, por tanto, el contenido de humedad es mayor en estas primeras horas. Patero y Augusto (2015) constataron la eficacia de la sonicación en granos de sorgo, ya que el tiempo para alcanzar el 90% del contenido de humedad de equilibrio, fue un 40% menor cuando se aplicaron ultrasonidos.

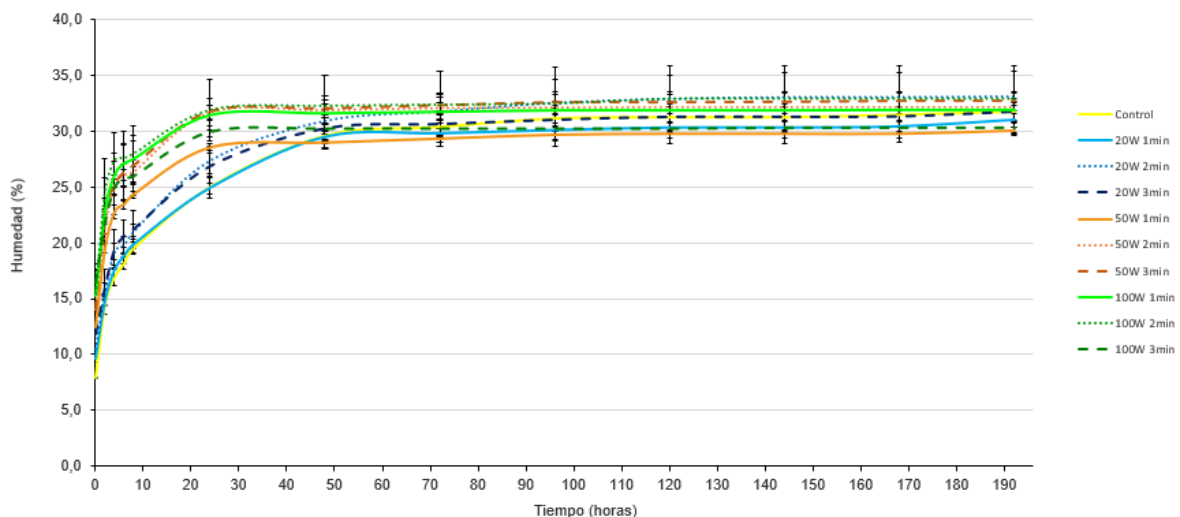


Figura 13. Evolución de la humedad (%) de las semillas durante 8 días (tiempo en horas). Las semillas fueron tratadas a diferentes potencias (20-50-100 W) durante 1, 2 y 3 min. Las barras corresponden al error estándar.

Tabla 3. Efecto de la potencia (20-50-100 W) y del tiempo (1-2-3 min) del tratamiento con ultrasonidos sobre la humedad de las semillas (%) en distintos momentos del ensayo de imbibición.

	0 h	8 h	24 h	48 h	72 h	96 h
Potencia (W)						
Control	7,88c	19,53b	25,03b	29,63	30,42	31,17
20	10,62b	20,70b	26,39b	30,21	30,72	31,21
50	13,51a	25,85a	30,62a	30,90	31,17	31,39
100	15,75a	27,18a	31,10a	31,60	31,44	31,51
Tiempo (min)						
1	11,30	22,82	27,48	29,92	30,31	30,69
2	11,97	23,41	28,38	31,15	31,63	32,06
3	12,55	23,72	28,98	30,51	30,87	31,22
Parámetros (Grados de libertad)						
	% suma de cuadrados					
P: Potencia (3)	54,61 **	63,12 **	56,63 **	8,54 NS	2,66 NS	0,26 NS
T: Tiempo (2)	1,62 NS	0,83 NS	3,11 NS	4,97 NS	5,00 NS	4,23 NS
P x T (6)	1,01 NS	2,66 NS	5,25 NS	9,91 NS	9,07 NS	7,82 NS
Residual (36)	42,77	33,39	35,01	76,57	83,27	87,69
Desviación estándar	3,033	2,738	2,382	2,285	2,548	2,940

Letras diferentes en una columna indican diferencias significativas con $P \leq 0,05$ según el test LSD. NS: No Significativo. ** Estadísticamente significativo ($P \leq 0,01$). La desviación estándar se ha calculado como la raíz cuadrada del cuadrado medio residual.

Respecto al proceso de imbibición, en las primeras 24 h se observa (Figura 14) una notable imbibición por parte de las semillas, independientemente de su tratamiento con ultrasonidos. Tras los análisis de la varianza (ANOVA; Tabla 4), se puede afirmar que el factor potencia, tuvo un efecto significativo ($P \leq 0,01$) sobre el porcentaje de imbibición. A las 8 h de imbibición, las semillas tratadas con potencias más altas, mostraron un valor más alto en la imbibición, es decir, absorbieron más agua en las primeras horas, presentando también los mayores porcentajes de humedad (Tabla 3). A partir de las 48 h, las semillas que mostraron mayor porcentaje de imbibición son las semillas tratadas con potencias más bajas, ya que partían de humedades más bajas (Tabla 3).

La imbibición de las semillas tratadas con una potencia de 20 W se estabilizó a las 96 h, igual que en las semillas control. Por otro lado, las semillas tratadas con las potencias más altas, se estabilizaron a las 24 h, ya que ya habían alcanzado su humedad máxima (Tabla 3). Los valores más altos de imbibición ($> 30\%$) se dieron en las semillas control y en las semillas tratadas con una potencia de 20 W. Esto se debe a que no existieron diferencias significativas en cuanto a la humedad máxima alcanzada por las semillas, pero sí en su humedad de partida (Tabla 3).

Estos resultados están de acuerdo con los resultados publicados por Ranjbari *et al.* (2013), que constataron que, en etapas iniciales, las semillas tratadas absorbieron agua más rápido que el control, probablemente debido al proceso de cavitación producida por el sonicador. Resultados similares se obtuvieron con granos de arroz descascarillado, donde los ultrasonidos alteraron la microestructura de la superficie de los granos (Ding *et al.*, 2018).

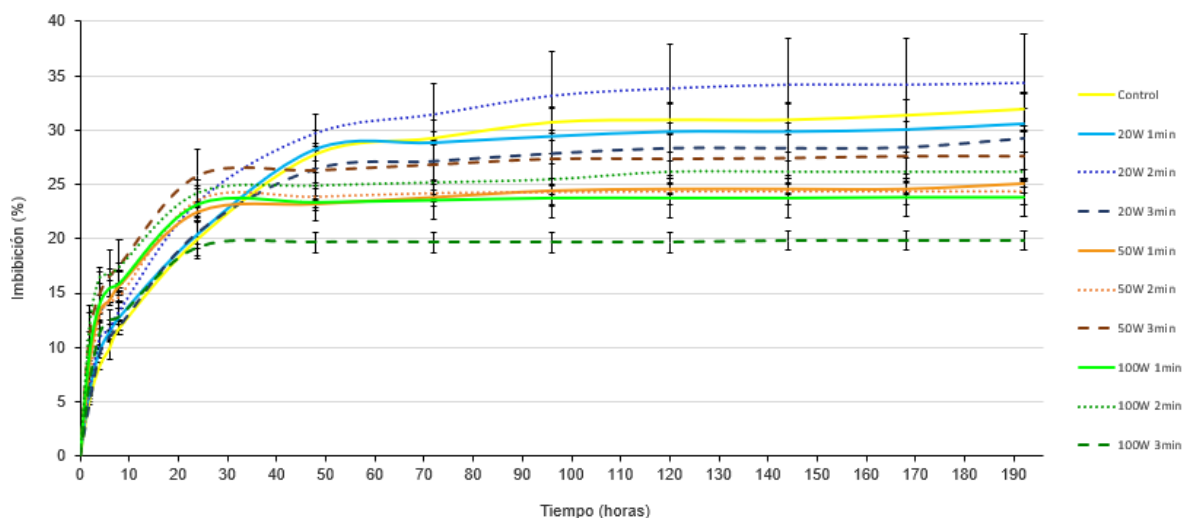


Figura 14. Evolución de la imbibición (%) de las semillas durante 8 días (tiempo en horas). Las semillas fueron tratadas a diferentes potencias (20-50-100 W) durante 1, 2 y 3 min. Las barras corresponden al error estándar.

Tabla 4. Efecto de la potencia (20-50-100 W) y del tiempo (1-2-3 min) del tratamiento con ultrasonidos sobre la imbibición de las semillas (%) en distintos momentos del ensayo de imbibición.

	8 h	24 h	48 h	72 h	96 h	
Potencia (W)						
Control	11,80 b	20,03	27,83 a	29,29 a	30,76 a	
20	12,72 b	21,49	28,13 a	29,14 a	30,14 a	
50	15,99 a	23,96	24,47 b	24,96 b	25,37 b	
100	15,73 a	22,35	22,82 b	23,00 b	23,18 b	
Tiempo (min)						
1	14,32	21,66	25,82	26,55	27,28	
2	14,32	22,80	26,57	27,52	28,41	
3	13,53	21,40	25,05	25,72	26,39	
Parámetros (Grados de libertad)		% suma de cuadrados				
P: Potencia (3)	54,03 **	14,24 NS	31,19 **	34,16 **	33,59 **	
T: Tiempo (2)	2,20 NS	2,60 NS	2,40 NS	2,53 NS	2,25 NS	
P x T (6)	22,19 **	13,05 NS	11,17 NS	9,97 NS	8,81 NS	
Residual (36)	21,58	70,10	55,24	53,34	55,35	
Desviación estándar		1,336	3,643	3,457	3,908	4,728

Letras diferentes en una columna indican diferencias significativas con $P \leq 0,05$ según el test LSD. NS: No Significativo. ** Estadísticamente significativo ($P \leq 0,01$). La desviación estándar se ha calculado como la raíz cuadrada del cuadrado medio residual.

En cuanto a los resultados del ensayo de la entrada del colorante azul de metileno, en la Figura 15 se presenta la semilla antes de iniciar el ensayo.

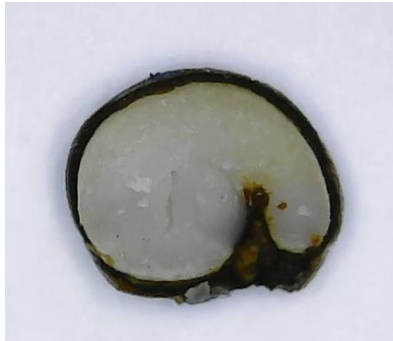


Figura 15. Semilla antes de realizar el ensayo con colorante azul de metileno.

En la Figura 16, se observa el frente de avance del azul de metileno en la semilla durante la imbibición. La entrada es principalmente por la región del hilo tanto en las semillas control como en las sonicadas. Las semillas control y en las de los tratamientos con una potencia de 20 W, muestran la ausencia de colorante en la primera fase, mientras que las semillas tratadas con potencias más altas, muestran ya a las 8 h coloración azul en la región del hilo de las semillas. Esto corrobora lo visto anteriormente en imbibición, los tratamientos más potentes, producen una mayor imbibición (%) en las primeras horas (Tabla 4). En cambio, a partir de las 48 h no existieron diferencias significativas entre tratamientos en cuanto a la humedad de las semillas (Tabla 3), aunque aparentemente el colorante tiñó con mayor intensidad a mayor potencia y tiempo del tratamiento (Figura 19), lo que podría deberse al diferente comportamiento del colorante frente al agua.

En el proceso de imbibición, se forma un frente de humedad, de modo que no toda la semilla se humedece simultáneamente (Bewley y Black, 1994). Tal y como ocurrió en el trabajo de Juan (2017), el colorante penetró inicialmente por la región del hilo, siguiendo por “el canal de agua” hasta llegar a la chalaza, a través de la cual penetró en el endospermo y avanzó progresivamente hasta colorear completamente el embrión, lo que ocurrió a los 8 días de remojo con este mismo colorante. Este modelo de humectación indica que la degradación de la cubierta (testa) es limitada y no permite la imbibición a través de la misma, fuera de la región hilar.

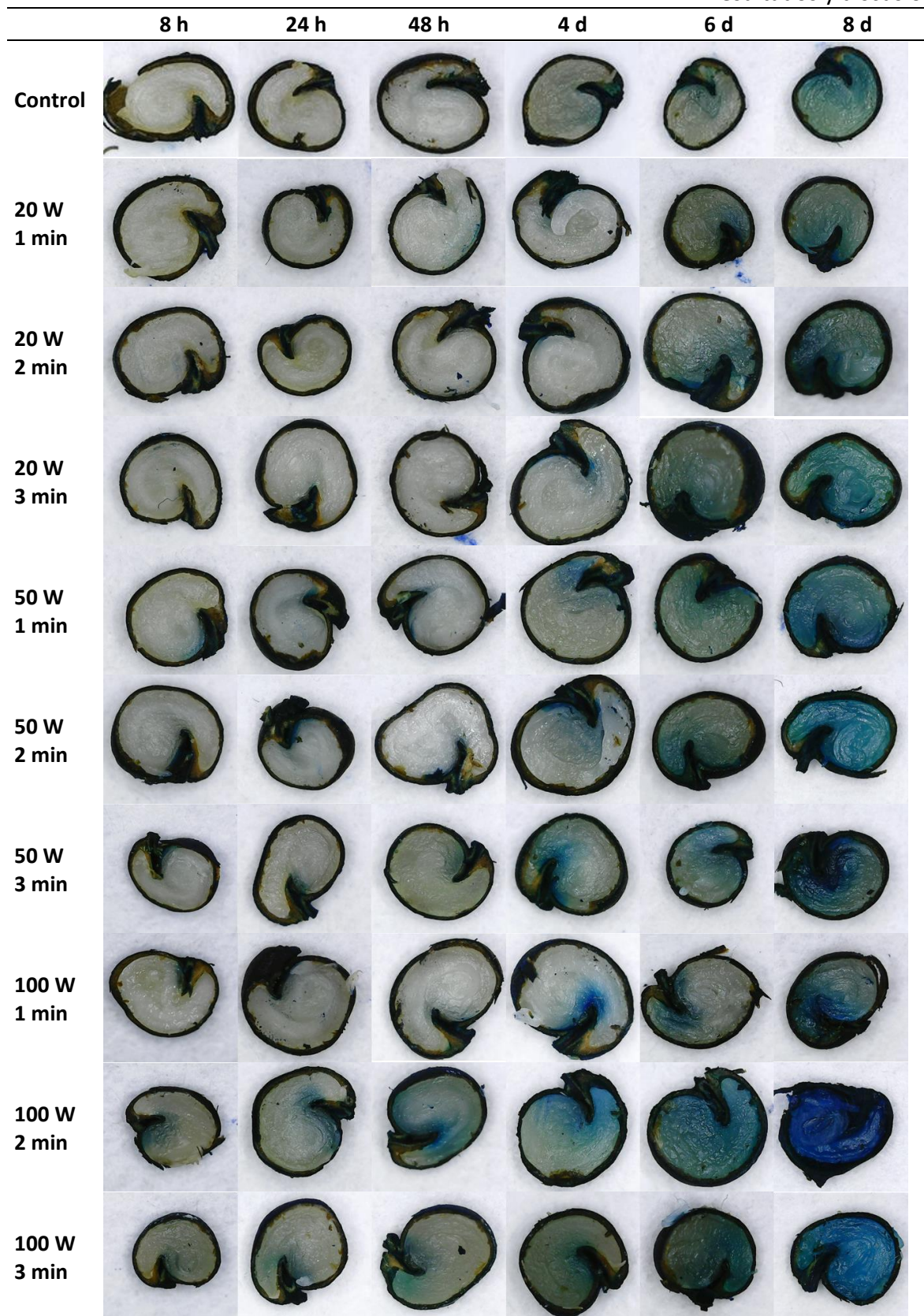


Figura 16. Evolución de la absorción de la solución azul de metileno a lo largo de 8 días. Semillas tratadas con el sonicador a diferentes potencias (20-50-100 W) durante 1, 2 y 3 min.

4.1.3. Ensayo de germinación

Al iniciar el ensayo, se determinó la viabilidad del lote de las semillas empleadas, siendo del 80% [sumando los niveles A (semillas sanas; 55%) y B (semillas débiles pero viables; 25%)].

La germinación tanto de las semillas humedecidas con agua como con AG_3 , se muestra en la Figura 17. Como se observa, las semillas tratadas con AG_3 (líneas discontinuas) germinaron en mayor porcentaje que las semillas humedecidas con agua (líneas continuas), excluyendo las tratadas con la potencia más alta, que obtuvieron valores similares al agua. Al finalizar el ensayo de germinación (100 d) la germinación de las semillas humedecidas con agua, tanto las semillas control como las tratadas con ultrasonidos, fue aproximadamente del 6%. Este bajo porcentaje de germinación no permitió el ajuste logístico de la germinación de estas semillas, por lo que no han podido incluirse en el análisis estadístico. Analizando la viabilidad de las semillas humedecidas con agua no germinadas (datos no presentados) se observa que el 90% de éstas (en promedio de todos los tratamientos) correspondían a semillas no viables (niveles C y D). Esto se podría deber a que, dado el largo periodo del ensayo de germinación, las posibilidades de infección y degradación de las semillas son muy elevadas, sobre todo para las semillas que inicialmente presentaban un bajo vigor (tipo B). En cuanto a las semillas humedecidas con AG_3 , las que fueron sometidas a una potencia de 100 W durante 3 min presentaron una germinación del 0%, lo que como en el caso anterior impidió su ajuste logístico y por tanto la inclusión de esta potencia en el análisis estadístico. En este caso al analizar la viabilidad de las semillas no germinadas al transcurrir los 100 días del ensayo, se observó que el 100% correspondía a semillas no viables. Los valores de germinación de las semillas humedecidas con AG_3 (control, 20 y 50 W), de hasta el 70%, son valores coherentes de acuerdo con la viabilidad del lote que era de un 80%. Al analizar la viabilidad de las semillas control o tratadas con 20 y 50 W y humedecidas con AG_3 que no germinaron en los 100 días que duró el estudio, se constató que la práctica totalidad de semillas no germinadas, eran no viables.

De los análisis de la varianza (datos no mostrados) se deduce que tanto el efecto de los factores como de sus interacciones resultó significativa ($P \leq 0,01$). La solución empleada representó el 49% de la variabilidad de la germinación, mientras que la potencia y duración del tratamiento supusieron el 21% y el 2%, respectivamente. Respecto a las interacciones de los factores analizados, todas resultaron significativas ($P \leq 0,01$), destacando la interacción entre la potencia y la solución, que representó el 24%, de la variabilidad, debido a que las semillas sometidas a potencias de 100 W, y que fueron humedecidas con AG_3 , obtuvieron valores similares a las semillas humedecidas con agua.

El resultado obtenido con la adición de AG_3 al sustrato coincide con los resultados obtenidos en estudios anteriores, aumentando significativamente ($P \leq 0.01$) los valores de la germinación (Pascual *et al.*, 2003; Pascual *et al.*, 2004; Juan, 2017). Esto mismo ocurrió, en todos los ensayos llevados a cabo en este Trabajo Fin de Máster.

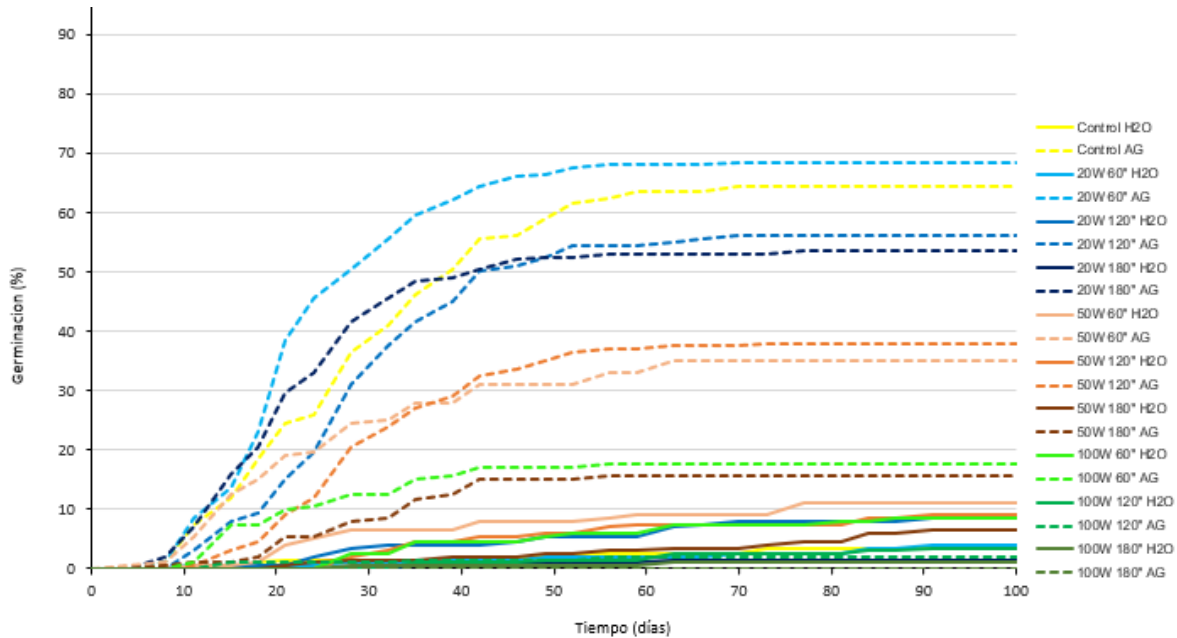


Figura 17. Curvas de germinación (%) durante 100 d antes de ajustar al modelo logístico. Las semillas se sonicaron con diferentes potencias (20-50-100 W) durante tiempos diferentes (0-60-120-180 s) y fueron humedecidas con agua y AG₃ durante el proceso de germinación.

En las semillas control y tratadas con potencias de 20 y 50 W y humedecidas con AG₃, el ajuste de los datos de germinación al modelo logístico fue significativo ($P \leq 0,01$), con un coeficiente de determinación (R^2) superior al 96%, lo que confirma que la función logística es adecuada para analizar la germinación de las semillas de alcaparra, tal y como ocurrió, en anteriores estudios realizados por el equipo de investigación sobre la germinación de las semillas de alcaparra (Pascual *et al.*, 2003; Pascual *et al.*, 2004; Pascual *et al.*, 2009; Juan, 2017). Tras ajustar las curvas de germinación al modelo logístico, se determinaron los parámetros A, β y k y se calcularon los parámetros T_{50} y $k/2$.

Los porcentajes de germinación, tanto real (G) como la obtenida del modelo logístico (A; Tabla 5), así como el T_{50} , fueron afectados significativamente ($P \leq 0,01$) por la potencia aplicada, el tiempo de aplicación, así como por sus interacciones. La potencia fue determinante en el porcentaje de germinación, representando el 77% de la variabilidad de G y A. En ambos casos, el control mostró porcentajes de germinación más altos (65% de germinación) que las semillas tratadas con ultrasonidos. Las semillas tratadas con potencias de 20 W mostraron valores más altos que las tratadas con 50 W ($P \leq 0,05$; 60% y 30%, respectivamente), con un menor T_{50} ($P \leq 0,05$; 23,3 y 26,2 d, respectivamente) y con una mayor velocidad media relativa de germinación ($P \leq 0,05$; 0,09 y 0,08 d^{-1}). Respecto al tiempo de aplicación, la aplicación del tratamiento de ultrasonidos durante 180 s hizo disminuir ($P \leq 0,01$) la germinación.

Al analizar la interacción (Figura 18), se observa que las semillas sometidas a 20 W obtuvieron una germinación equivalente a las semillas control cuando el tratamiento se aplicó durante 60 y 120 s, sin diferencias entre ellas, aunque 60 s adelantó el proceso (menor T_{50} ; $P \leq 0,05$). Cuando el tratamiento se prolongó hasta 180 s, la germinación resultó inferior ($P \leq 0,05$). Las semillas sonicadas con 50 W, durante los tres periodos de tiempo, obtuvieron menores porcentajes de germinación ($P \leq 0,05$) que las semillas control.

Estos resultados no coinciden con los obtenidos por Pascual *et al.* (2004) donde los tratamientos con ultrasonidos aumentaron ($P \leq 0,05$) la germinación de semillas de alcaparra, alcanzando un 70% de germinación, aunque en aquel estudio el tratamiento de ultrasonidos se realizó con un baño de ultrasonidos con menor potencia.

En estudios con otras especies como *Dioscorea* spp., brócoli y alfalfa los tratamientos con ultrasonidos aumentaron ($P \leq 0,05$) la germinación de las semillas (Kim *et al.*, 2006; Andriamparany *et al.*, 2019). En otros estudios, los ultrasonidos no afectaron significativamente a la germinación de las semillas intactas, pero mejoró la germinación de semillas deterioradas (López y Vicient, 2017).

A la vista de los resultados, la sonicación no mejoró el porcentaje de germinación con las potencias y tiempos ensayados a pesar de que el tratamiento con una potencia de 20 W durante 1 min, mejoró el porcentaje de germinación respecto al control, aunque no de manera significativa, adelantando, significativamente el tiempo necesario para alcanzar el 50% de la germinación. La disminución de la germinación de las semillas sometidas a 50 W, y principalmente a 100 W, podría estar relacionado con que la cavitación a mayores potencias podría dañar al embrión y/o endospermo.

Tabla 5. Efecto de la potencia (W) y la duración (min) del tratamiento con ultrasonidos en la germinación acumulada (G, %), máximo porcentaje de germinación (A, %), número de días necesarios para alcanzar el 50% de la germinación final ($T_{50} = \beta/k$, d) y velocidad media relativa de germinación acumulada ($k/2$, d^{-1}). Semillas humedecidas con AG₃.

		G	A	T ₅₀	k/2
Potencia (W)					
	Control	64,50 a	64,34 a	27,16 a	0,062 c
	20	59,33 b	58,76 b	23,33 b	0,089 a
	50	29,50 c	29,09 c	26,23 a	0,077 b
Tiempo (min)					
	1	56,00 a	55,38 a	23,36 b	0,077
	2	52,83 a	52,52 a	28,01 a	0,072
	3	44,50 b	44,28 b	25,35 b	0,078
Parámetros (Grados de libertad)		% suma de cuadrados			
	P: Potencia (2)	76,52 **	77,10 **	17,05 **	41,64 **
	T: Tiempo (2)	7,56 **	7,14 **	23,24 **	1,94 NS
	P x T (4)	7,72 **	7,31 **	24,31 **	6,44 NS
	Residual (27)	8,20	8,46	35,40	49,98
	Desviación estándar	5,831	5,918	2,710	0,014

Letras diferentes en una columna indican diferencias significativas con $P \leq 0,05$ según el test LSD. NS: No Significativo. ** Estadísticamente significativo ($P \leq 0,01$). La desviación estándar se ha calculado como la raíz cuadrada del cuadrado medio residual.

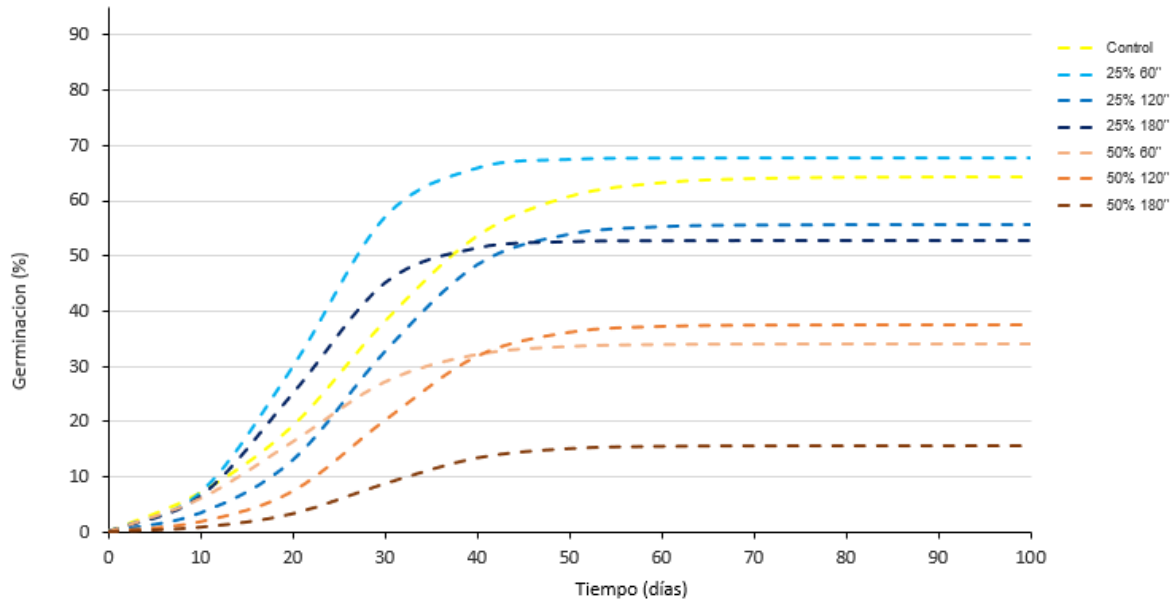


Figura 18. Modelo logístico ajustado a la germinación acumulada correspondiente a los tratamientos con potencias de 20 y 50 W; y a los tiempos de 0, 1, 2 y 3 min. Semillas humedecidas con AG₃.

4.2. TRATAMIENTOS CON RADIACIÓN LÁSER HE-NE

4.2.1. Ensayo de imbibición

La humedad aumentó notablemente en las primeras 24 h del ensayo (Figura 19). Como es lógico los valores iniciales de humedad son muy similares, puesto que se parte de un lote uniforme (humedad del lote del 8,6%), aumentando hasta estabilizarse a las 96 h. Tras el análisis estadístico de los resultados (Tabla 6), se constata que no existieron diferencias significativas ($P \leq 0,05$) entre los tratamientos, incluido el control. Por lo tanto, los tratamientos con láser no afectaron de manera significativa a la humedad final de las semillas.

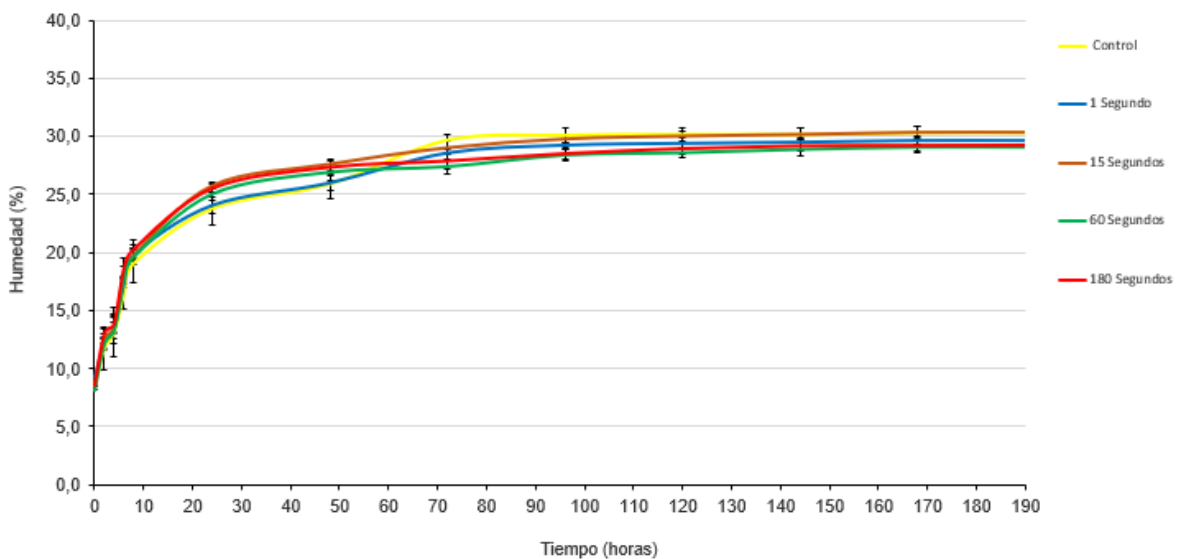


Figura 19. Evolución de la humedad (%) de las semillas durante 8 días (tiempo en horas). Las semillas fueron irradiadas durante diferentes tiempos (0-1-15-60-180 s). Las barras corresponden al error estándar.

Tabla 6. Efecto de la irradiación con rayos láser HE-NE sobre la humedad de las semillas en distintos momentos del ensayo de imbibición.

	0 h	8 h	24 h	48 h	72 h	96 h
Tiempo (segundos)						
Control	8,58	19,05	23,75	25,85	29,61	30,05
1	9,27	19,86	24,11	26,05	28,64	29,31
15	8,48	19,75	25,77	27,63	29,04	29,81
60	8,17	19,63	25,04	26,92	27,40	28,39
180	8,51	20,30	25,55	27,38	27,92	28,57
Parámetros (Grados de libertad)			% suma de cuadrados			
Tiempo(4)	11,51 NS	6,11 NS	25,67 NS	20,93 NS	40,73 NS	30,04 NS
Residual (15)	88,49	93,89	74,33	79,07	59,27	47,46
Desviación estándar	1,161	1,827	1,552	1,584	1,095	0,952

NS: No Significativo. La desviación estándar se ha calculado como la raíz cuadrada del cuadrado medio residual.

En cuanto al proceso de imbibición (Figura 20), se produjo una notable imbibición en las primeras 24 h, estabilizándose a las 96 h. Del análisis estadístico (Tabla 7), se concluye que no existió diferencias significativas ($P \leq 0,05$) entre los diferentes tratamientos, incluido el control. Los valores máximos de imbibición alcanzados están comprendidos entre 28,1% y 30,7%. En este caso, los tratamientos con rayos láser tampoco influyeron en la imbibición de las semillas.

Respecto al momento de estabilización del proceso de imbibición, en todos los tratamientos se estabilizó a las 96 h, coincidiendo con la del tratamiento control del apartado de sonicación. Esto podría llevar a pensar, que el punto de equilibrio donde se estabiliza la absorción de agua en las semillas de alcaparra es a las 96 h, siempre y cuando se utilicen semillas cuyas cubiertas no estén deterioradas, tal y como constataron Foschi *et al.* (2020).

Contrario a los resultados obtenidos, el peso de semillas irradiadas de habas y altramuces blancos, aumentaron más rápido durante la imbibición en comparación con las no irradiadas. Este aumento se debió más a cambios internos en la semilla, como la aceleración del metabolismo que a posibles perforaciones en la cubierta de las semillas (Podlešny *et al.*, 2012).

La imbibición después de los tratamientos con ultrasonidos al igual que la irradiación con láser sigue el modelo trifásico de absorción. Durante la primera fase el contenido de humedad aumenta rápidamente para estabilizarse en la segunda fase. En la tercera fase o fase final (no determinada en este ensayo), de nuevo se incrementaría el contenido en agua, lo que está relacionado con la rotura de la cubierta producida por el alargamiento de las células y la aparición de la radícula (Hatmann *et al.*, 2014). En ambos ensayos, se observan claramente las dos primeras fases, que tienen lugar antes de la emergencia de la radícula. En otros estudios donde se realizaron ensayos de imbibición durante 8 días, en semillas de alcaparra de diferentes edades, también se muestra claramente las dos primeras fases en la absorción de agua por parte de las semillas (Juan, 2017).

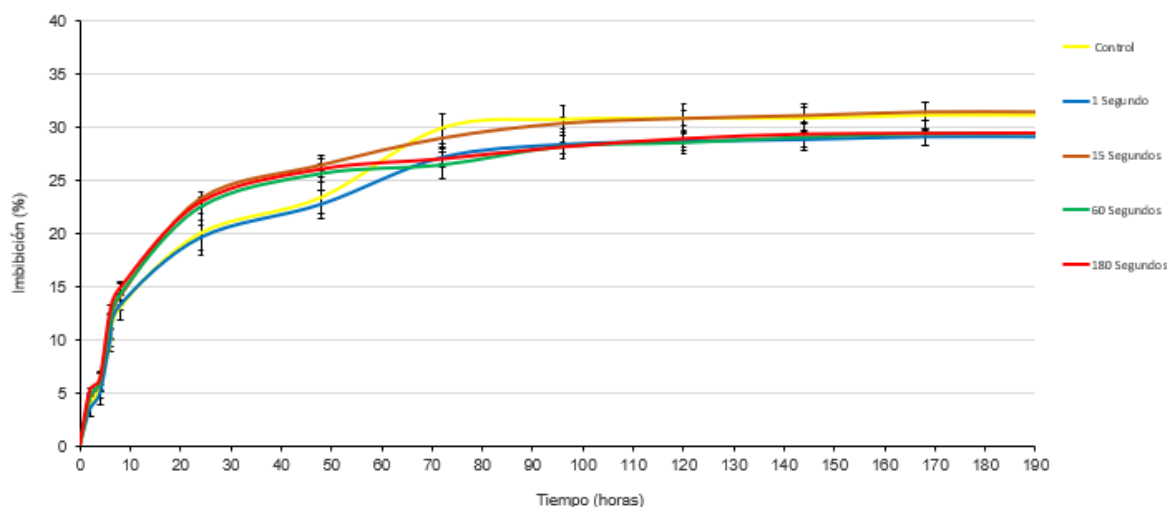


Figura 20. Evolución del proceso de imbibición (%) de las semillas durante 8 días (tiempo en segundos). Las semillas fueron irradiadas durante diferentes tiempos (0-1-15-60-180 s). Las barras corresponden al error estándar.

Tabla 7. Efecto de la irradiación con rayos láser HE-NE sobre la imbibición de las semillas en distintos momentos del ensayo de imbibición.

	8 h	24 h	48 h	72 h	96 h
Tiempo (segundos)					
Control	13,00	19,98	23,34	29,89	30,70
1	13,23	19,59	22,74	27,15	28,37
15	14,05	23,29	26,47	29,00	30,39
60	14,28	22,54	25,70	26,52	28,26
180	14,82	22,90	26,00	26,96	28,08
Parámetros (Grados de libertad)		% suma de cuadrados			
Tiempo (4)	20,47 NS	36,13 NS	33,75 NS	34,55 NS	30,17 NS
Residual (15)	79,53	63,87	66,25	65,45	69,83
Desviación estándar	1,5326	2,3857	2,4435	2,0759	2,0002

NS: No Significativo. La desviación estándar se ha calculado como la raíz cuadrada del cuadrado medio residual.

La Figura 21 muestra la evolución de la absorción del azul de metileno por parte de la semilla. La absorción del colorante es similar en todos los tratamientos, coincidiendo con los resultados presentados en Tablas 6 y 7 en el sentido de que no existieron diferencias significativas en el proceso de imbibición. A la vista de los resultados, se confirma que con la irradiación con rayos láser (de las características y con los tiempos utilizados) no se mejoró ninguno de los parámetros estudiados. Esto indica que la irradiación con rayos láser no ha modificado de manera significativa la cubierta de las semillas, de manera que la entrada de agua en todos los tratamientos ha sido a través de la región del hilo de la semilla y en ningún caso, a través de la cubierta. La hidratación de las semillas coincide con lo estudiado en otros trabajos sobre alcaparra, donde, se muestra que la

hidratación comienza a través de la región hilar mientras que la región extrahilar es impermeable (Foschi *et al.*, 2020).

Contrario a lo mostrado en este estudio, Soliman *et al.* (2009) obtuvieron que las cubiertas de las semillas de *Acacia farnesiana* L., sí que fueron afectadas por rayos láser, modificando la entrada de agua en las mismas. Es importantes remarcar, que además de las características de la irradiación (longitud de onda, potencia, tiempo, ...) existen diferencias entre las características de las semillas de diferentes especies.

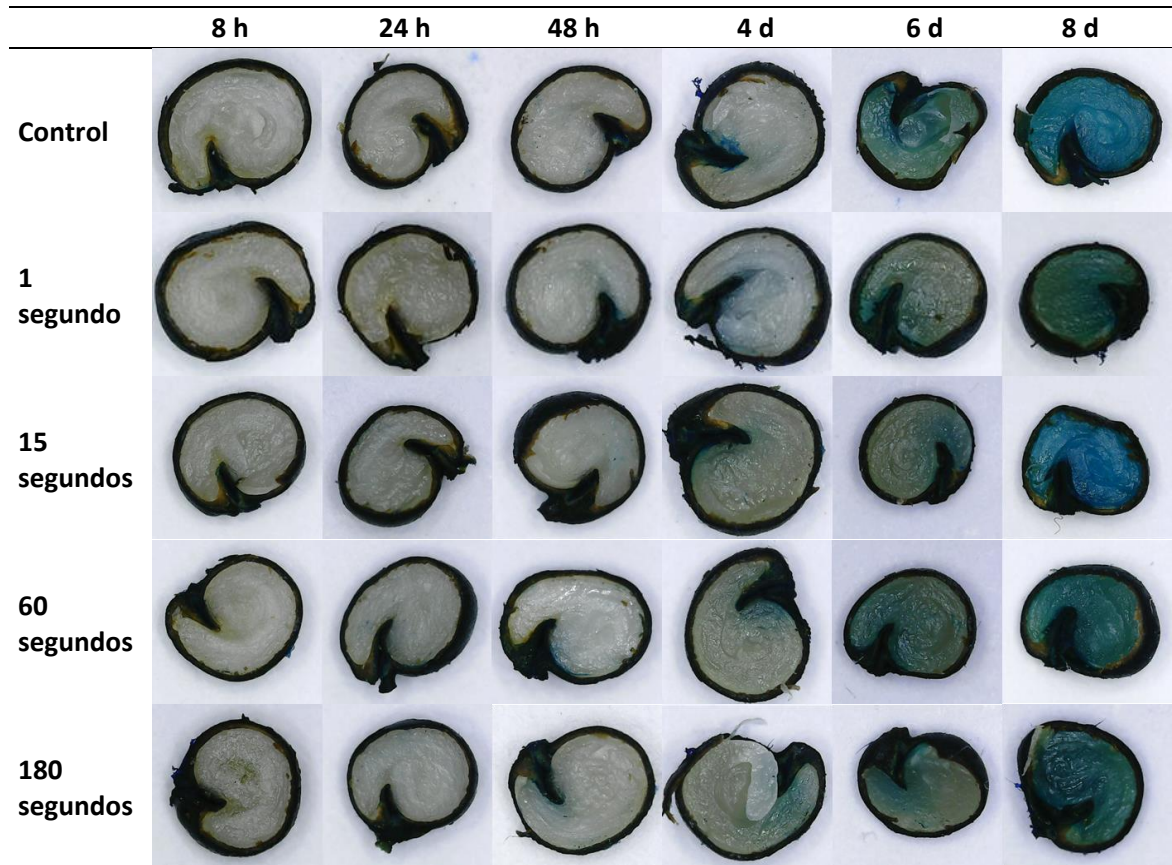


Figura 21. Evolución de la absorción de la solución azul de metileno a lo largo de 8 días. Semillas irradiadas durante diferentes tiempos (0-1-15-60-180 s).

4.2.2. Ensayo de germinación

Al analizar la germinación obtenida (Figura 22) tanto el tiempo de irradiación como la solución empleada resultaron estadísticamente significativos ($P \leq 0,01$; datos no mostrados), representado este último factor el 97% de la variabilidad. La interacción de ambos factores no resultó significativa ($P \leq 0,05$). La germinación obtenida con agua fue estadísticamente inferior a la obtenida con AG_3 , con valores inferiores al 10%, lo que impidió su ajuste logístico, y su inclusión en el posterior análisis estadístico. Tras los 100 d de ensayo, al analizar la viabilidad de las semillas no germinadas, casi el 50% estaban muertas (suma del nivel C y D) y el 40% correspondió a semillas viables pero débiles (B). Estas semillas pueden no haber tenido vigor suficiente para germinar en el periodo considerado, aunque podrían haber llegado a hacerlo si el ensayo se hubiese prolongado. En cambio, las semillas humedecidas con AG_3 , obtuvieron una germinación del 75% en promedio, Al analizar la viabilidad de las semillas que no habían germinado, la práctica totalidad eran no viables, tal y como cabía esperar, ya que la viabilidad de partida del lote era del 80%.

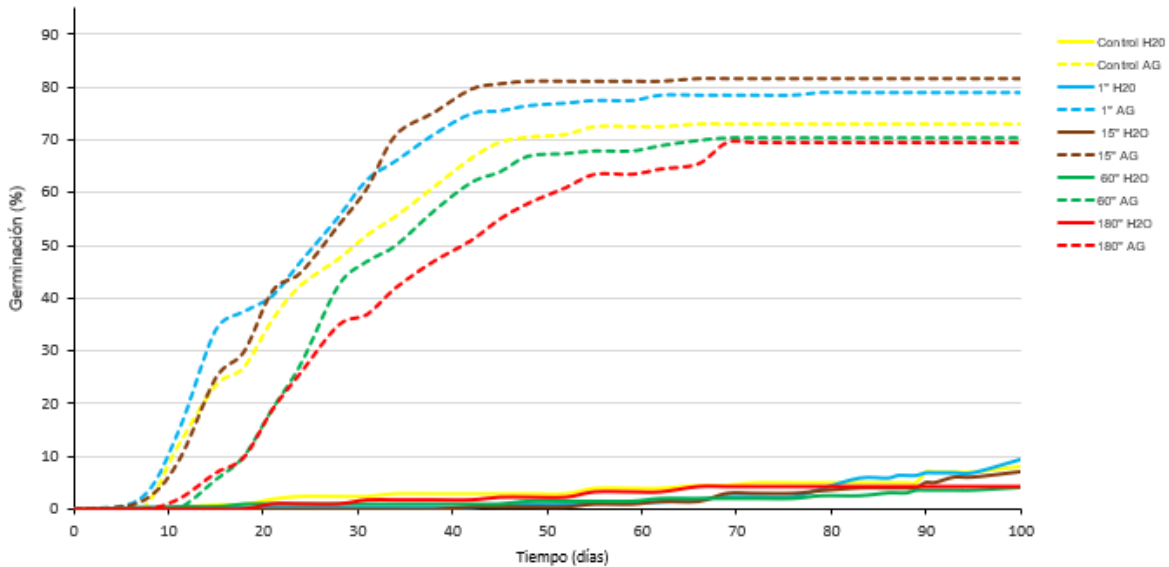


Figura 22. Curvas del porcentaje de germinación acumulada durante 100 d antes de ajustar al modelo logístico. Las semillas se irradiaron durante 0-1-15-60-180 s humedecidas con agua y AG₃.

El ajuste de los datos obtenidos con semillas humedecidas con AG₃ al modelo logístico resultó estadísticamente significativo ($P \leq 0,05$), con un coeficiente de determinación (R^2) superior al 95%, tal y como ocurrió en el apartado anterior. En la Figura 23 se muestran las curvas de germinación ajustadas al modelo logístico, encontrándose todas en un rango entre 73 y 82% de germinación.

Tras realizar los análisis estadísticos (Tabla 8), se concluye que la irradiación de semillas con láser no influyó en el porcentaje de germinación de las semillas ($P \leq 0,05$) ni en la velocidad media relativa de germinación ($k/2$). Respecto al parámetro T_{50} , la irradiación sí que resultó significativa ($P \leq 0,05$) ya que las semillas irradiadas durante 1 y 15 s, alcanzaron el T_{50} antes que las semillas irradiadas durante 60 y 180 s, encontrándose el control entre ambos grupos.

Se decidió irradiar con láser durante 1, 15, 60 y 180 s, puesto que en estudios anteriores (Juan, 2017), se aplicó la irradiación durante 10, 30, 60 y 120 s y todos los tiempos redujeron significativamente ($P \leq 0,05$) la germinación. Por ello, se seleccionaron tiempos tanto inferiores como superiores. Los resultados coinciden con los obtenidos por Juan (2017) en el sentido de que la irradiación con láser no mejoró la germinación de las semillas de alcaparra. Álvarez *et al.* (2011) obtuvieron resultados similares en semillas de tomate irradiadas con un láser He-Ne, en el que tampoco se mejoró significativamente la germinación de las semillas, debido probablemente al corto tiempo de irradiación (≤ 60 s). Krawiec *et al.* (2018) indicaron que la respuesta de las semillas al láser mejoraba al irradiarlas entre 3 y 5 veces. A diferencia de los resultados obtenidos, según Podleśny *et al.* (2012) la irradiación láser mejoró la germinación en semillas de altramujo blanco (*Lupinus albus* L.) y habas (*Vicia faba* L.); los tratamientos aplicados aumentaron la actividad enzimática amilolítica [aumentando el contenido en ácido indol-acético (IAA)] y eso mejoró la germinación. De acuerdo con Chen *et al.*, (2005), la radiación láser He-Ne provoca un incremento de la actividad enzimática y acelera las reacciones catalizadas por las enzimas, debido a un campo electromagnético y a la energía térmica que afecta a las células, y aumenta su actividad biológica. También, se ha obtenido resultados positivos con el láser He-Ne en la germinación de las semillas

de diversas especies como trigo (Rong *et al.*, 2002, y Jamil *et al.*, 2013) y cebada (Szajnsner y Drozd, 2003).

Los efectos de la radiación láser dependen de muchos parámetros, como la longitud de onda, tiempo de exposición, potencia, dosis y métodos de irradiación (constante o pulso) así como de las características de las semillas (Krawiec *et al.*, 2018). A la vista de los resultados, las semillas irradiadas durante 1 y 15 s, mostraron una mejor germinación respecto a los otros tratamientos y al control, pero no de manera significativa, sin embargo, sí alcanzaron el T_{50} antes que el resto de tratamientos ($P \leq 0,05$).

Tabla 8. Efecto de la irradiación con el láser HE-NE durante 0, 1, 15, 60 y 180 s en la germinación acumulada (G, %), máximo porcentaje de germinación (A, %), número de días necesarios para alcanzar el 50% de la germinación final ($T_{50} = \beta/k$, d) y velocidad media relativa de germinación acumulada ($k/2$, d^{-1}). Semillas humedecidas con AG_3 .

	G	A	T_{50}	k/2
Tiempo (segundos)				
Control	73,00	72,81	22,78 bc	0,070
1	79,00	78,69	20,46 c	0,071
15	81,75	81,96	22,42 c	0,089
60	70,50	69,86	27,41 ab	0,088
180	69,50	69,10	30,68 a	0,061
Parámetros (Grados de libertad)		% suma de cuadrados		
Tiempo (4)	35,35 NS	35,59 NS	65,92 *	25,96 NS
Residual (15)	64,65	64,41	34,08	74,04
Desviación estándar		7,513	7,824	3,106
				0,021

Letras diferentes en una columna indican diferencias significativas con $P \leq 0,05$ según el test LSD. NS: No Significativo. * Estadísticamente significativo ($P \leq 0,05$). La desviación estándar se ha calculado como la raíz cuadrada del cuadrado medio residual.

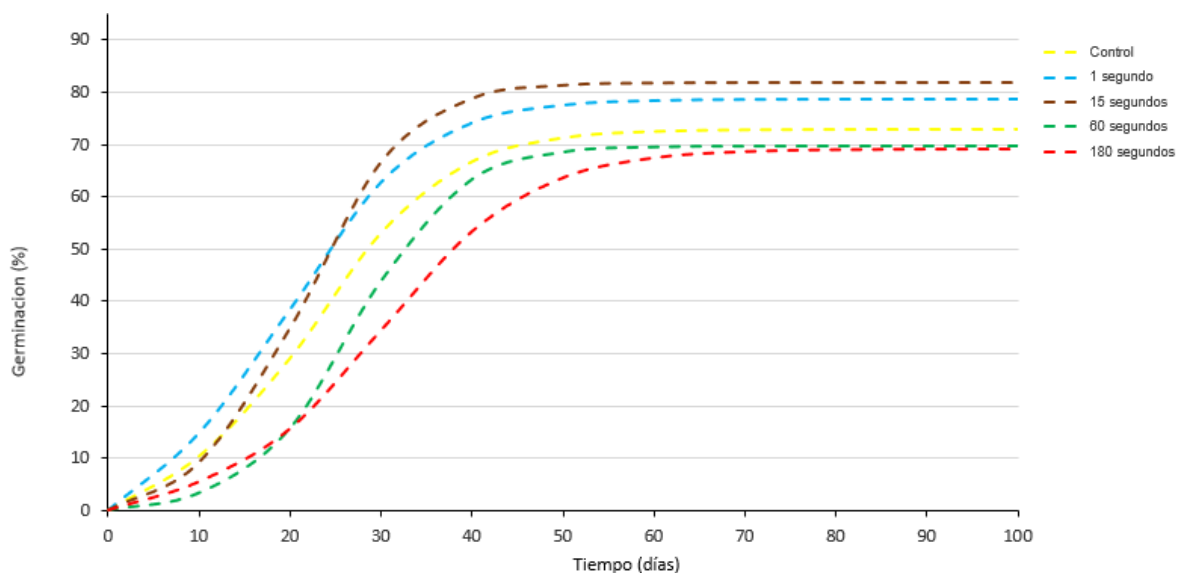


Figura 23. Modelo logístico ajustado a la germinación acumulada correspondiente a los valores medios de tratamientos irradiados durante 0-1-15-60-180 s. Semillas humedecidas con AG_3 .

4.3. ILUMINACIÓN CON DIFERENTES LONGITUDES DE ONDA

4.3.1. Ensayo de germinación

Las semillas humedecidas con agua obtuvieron un bajo porcentaje de germinación (en torno a un 3% Figura 24), lo que no permitió su ajuste logístico ni inclusión en el posterior análisis estadístico. Al analizar las semillas no germinadas, el 50% se mantenían viables (suma del nivel A+B), lo que podría significar, que, si se hubiese prolongado el ensayo, podrían haber llegado a germinar, sin embargo, una germinación después de 100 d, no es interesante comercialmente. Respecto a las semillas humedecidas con AG₃, los resultados no fueron tan homogéneos. Las semillas germinadas bajo luz blanca, roja más azul y en oscuridad, germinaron el 78, 69 y 70%, respectivamente, pudiéndose considerar está germinación como muy buena dada la viabilidad del lote (80%). Al analizar la viabilidad de las semillas no germinadas, la práctica totalidad de ellas eran no viables (nivel C+D). Las semillas germinadas bajo luz roja, obtuvieron un porcentaje de germinación del 35%, resultando no viables todas las semillas no germinadas, lo que podría deberse al fuerte ataque de hongos que apareció a partir del primer mes del ensayo. Finalmente, las semillas que germinaron bajo luz azul, tan solo obtuvieron el 7% de germinación, quedando la práctica totalidad de las semillas no germinadas como no viables, lo que podría deberse tanto a la influencia de la luz azul sobre al AG₃ como al ataque de hongos, a partir de los 75 días del ensayo. En este sentido Hirose *et al.* (2012) indicaron que la luz azul podía reducir el contenido en giberelinas activas y esto podría haber afectado también en el presente estudio, reduciendo el efecto positivo del AG₃ aportado. La baja germinación obtenida con la luz azul, impidió su ajuste logístico y su análisis estadístico.

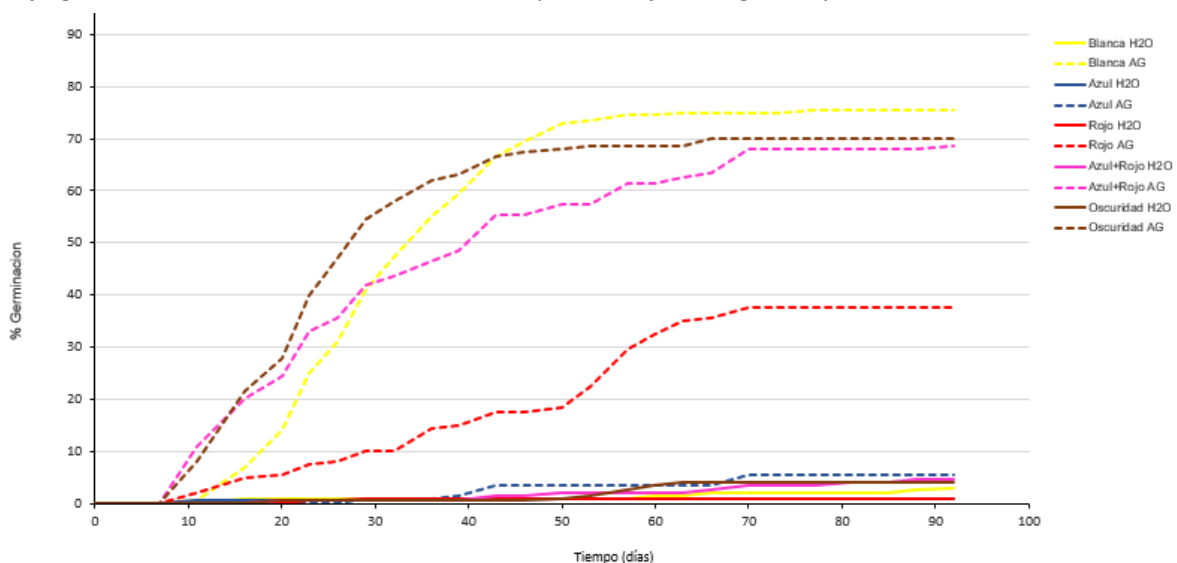


Figura 24. Curvas del porcentaje de germinación acumulada durante 100 d antes de ajustar al modelo logístico. Las semillas germinadas bajo luz blanca, roja, azul, roja más azul y en oscuridad humedecidas con agua y AG₃.

El tipo de luz, la solución utilizada para humedecer las semillas, y su interacción, afectaron significativamente a la germinación ($P \leq 0,01$; datos no mostrados), representando un 20%, 62% y 17% de la variabilidad, respectivamente. El hecho de que la interacción fuese significativa, se debió a la baja germinación que se obtuvo en aquellas semillas que crecieron bajo luz azul, independientemente de la solución con la que se regó.

El ajuste de los datos que así lo permitieron, al modelo logístico resultó estadísticamente significativo ($P \leq 0,05$), con un coeficiente de determinación (R^2) superiores al 96%, lo que confirma que la función logística es adecuada para analizar la germinación de las semillas de alcaparra, tal y como se ha visto en los apartados anteriores.

El tipo de luz influyó significativamente ($P \leq 0,01$; Tabla 9; Figura 25) en la germinación de las semillas. Las semillas germinadas bajo luz roja, obtuvieron una menor germinación ($P \leq 0,05$) que con el resto de luces. Como se ha comentado anteriormente, estas semillas sufrieron un fuerte ataque de hongos, principalmente por *Fusarium sp*, tras un mes de ensayo, que pudo ser estimulado por la radiación roja.

Las semillas germinadas en oscuridad presentaron el menor ($P \leq 0,05$) valor de T_{50} , seguidas de las germinadas bajo luz blanca y la combinación de rojo y azul. El tipo de luz también afectó ($P \leq 0,01$) a la velocidad de germinación ($k/2$), encontrándose los mayores valores bajo luz blanca y en oscuridad. Estos resultados están de acuerdo con estudios (no publicados) realizados en el mismo equipo de investigación, en los que no existieron diferencias significativas entre semillas germinadas en oscuridad y con luz blanca.

Paniagua *et al.* (2015) no obtuvieron diferencias en el porcentaje de germinación de semillas de brócoli iluminadas con luces LED de diferentes longitudes de onda (rojo, azul y verde); estos autores indicaron que diferentes longitudes de onda y tiempos de exposición pueden provocar diferencias fisiológicas en la germinación de las semillas y en el crecimiento de las plántulas. Moreno *et al.* (2017) y Marín (2016) tampoco obtuvieron diferencias significativas ($P \leq 0,05$) al aplicar luz blanca, roja, y azul en la variedad Serrano de pimiento (*Capssicumm annum* L.) y en orquídeas (*Encyclia sp*), respectivamente.

A la vista de los resultados, las semillas de alcaparra no necesitan luz para germinar, dado que la iluminación no mejoró la germinación.

Tabla 9. Efecto diferentes longitudes de onda (Luz blanca, LED roja, roja más azul y oscuridad) en la germinación acumulada (G, %), máximo porcentaje de germinación (A, %), número de días necesarios para alcanzar el 50% de la germinación final ($T_{50} = \beta/k$, días) y velocidad media relativa de germinación acumulada ($k/2$, d^{-1}). Semillas humedecidas con AG₃.

	G	A	T_{50}	$k/2$
Tipo de luz				
Blanca	75,50 a	75,31 a	28,83 b	0,079 a
Roja	37,50 b	40,43 b	46,40 a	0,039 b
Rojo+Azul	68,50 a	66,42 a	26,30 b	0,050 b
Oscuridad	70,00 a	69,17 a	21,84 c	0,088 a
Parámetros (Grados de libertad)		% suma de cuadrados		
Tipo de luz (3)	87,52 **	86,21 **	96,51 **	78,54 **
Residual (12)	12,48	13,79	3,49	21,46
Desviación estándar	6,487	6,155	2,047	0,012

Letras diferentes en una columna indican diferencias significativas con $P \leq 0,05$ según el test LSD. ** Estadísticamente significativo ($P \leq 0,01$). La desviación estándar se ha calculado como la raíz cuadrada del cuadrado medio residual.

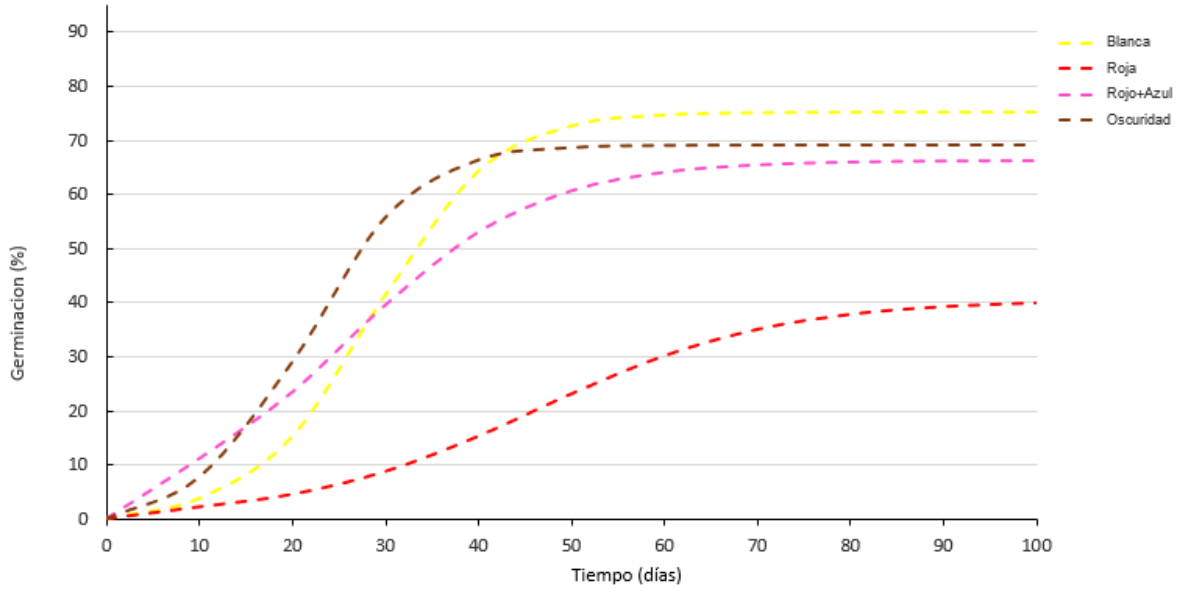


Figura 25. Modelo logístico ajustado a la germinación acumulada correspondiente a los tratamientos bajo una iluminación de diferentes longitudes de onda (Luz blanca, roja, la combinación de rojo más azul y en oscuridad). Semillas humedecidas con AG₃.

CONCLUSIONES

5. CONCLUSIONES

Con los tratamientos y condiciones ensayadas en este Trabajo Final de Máster, se concluye:

- En todos los ensayos se constata que para obtener una germinación adecuada se necesita la adición de ácido giberélico.
- El resultado obtenido con el tratamiento de ultrasonidos depende de la potencia aplicada y del tiempo de exposición, variando desde un adelanto de la germinación (20 W durante 1 min) hasta una disminución del porcentaje de germinación (100 W 3 min).
- El tratamiento con ultrasonidos afecta a la humedad de la semilla, aumentando ésta con el incremento de potencia y tiempo de exposición; en cambio, en el ensayo de imbibición, el contenido de humedad final de las semillas no se ve afectado por estos factores, por lo que el valor de la imbibición (%) se ve reducido a mayores potencias y tiempos de exposición.
- La irradiación de las semillas con rayo láser He-Ne no mejora ni adelanta la germinación; tampoco modifica el proceso de imbibición.
- Los ensayos con el colorante azul de metileno, indican que ni el tratamiento con ultrasonidos ni la irradiación con rayo láser He-Ne modifican la entrada de agua en la semilla durante la primera fase de la germinación, que se mantiene a través de la región hilar.
- Las semillas de alcaparra no necesitan iluminación para su germinación. La reducción del espectro de la iluminación aplicada, reduce el porcentaje de germinación.

BIBLIOGRAFÍA

6. BIBLIOGRAFÍA

- AL-Quraan, N. A., AL-Akhras, M. A. H., Talafha, D. A. Z. (2020). The influence of laser beam and high light intensity on lentil (*Lens culinaris*) and wheat (*Triticum aestivum*) seedlings growth and metabolism. *Plant Biosystems.*, 1-21.
- Álvarez, A., Ramírez, R., Chávez, L., Camejo, Y., Licea, L., Porras, E., García, B. (2011). Efectos del tratamiento de semillas con láser de baja potencia sobre el crecimiento y rendimiento en plantas de tomate (*Solanum lycopersicum* L.). *Información Técnica Económica Agraria*, 107(4), 290-299.
- Andriamparany, J. N., Buerkert, A. (2019). Effect of ultrasonic dormancy breaking on seed germination and seedling growth of three wild yam species (*Dioscorea* spp.) from SW-Madagascar. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 66(6), 1167-1174.
- Babaei-Ghaghelestany, A., Alebrahim, M. T., MacGregor, D. R., Khatami, S. A., Hasani Nasab Farzaneh, R. (2020). Evaluation of ultrasound technology to break seed dormancy of common lambsquarters (*Chenopodium album*). *Food science & nutrition*, 8(6), 2662-2669.
- Bewley, J.D.; Black, M. 1994. Seeds. Physiology of development and germination. Plenum Press, New York
- Brown, C. S., Schuerger, A. C., Sager, J. C. (1995). Growth and photomorphogenesis of pepper plants under red light-emitting diodes with supplemental blue or far-red lighting. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 120(5), 808-813.
- Brutnell, T. (2006). Phytochrome and light control of plant development. *Plant physiology*, 417-443.
- Bula, R. J., Morrow, R. C., Tibbitts, T. W., Barta, D. J., Ignatius, R. W., Martin, T. S. (1991). Light-emitting diodes as a radiation source for plants. *HortScience*, 26(2), 203-205.
- Calani, J. A. E., Gutiérrez, C. R. D. C. (2018). Uso de las luces led en la producción agrícola. *Revista Estudiantil AGRO-VET*, 2(2), 273-276.
- Chen Y.P., Liu Y.J., Wang X.L., Ren Z.Y., Yue M. 2005. Effect of microwave and He-Ne laser on enzyme activity and biophoton emission of *Isatis indigotica* Fort. *Journal of Integrative Plant Biology*, 47:849-855.
- Delgado, J. O. (2012). Aplicación del ultrasonido en la industria de los alimentos. *Publicaciones e Investigación*, 6, 141-152.
- Ding, J., Hou, G. G., Dong, M., Xiong, S., Zhao, S., Feng, H. (2018). Physicochemical properties of germinated dehulled rice flour and energy requirement in germination as affected by ultrasound treatment. *Ultrasonics sonochemistry*, 41, 484-491.
- Ding, Y., He, S., da Silva, J. A. T., Li, G., Tanaka, M. (2010). Effects of a new light source (cold cathode fluorescent lamps) on the growth of tree peony plantlets in vitro. *Scientia Horticulturae*, 125(2), 167-169.
- Foschi, M. L., Juan, M., Pascual, B., Pascual-Seva, N. (2020). Water Uptake and Germination of Caper (*Capparis spinosa* L.) Seeds. *Agronomy*, 10(6), 838.
- Ghafoor, M., Misra, N. N., Mahadevan, K., Tiwari, B. K. (2014). Ultrasound assisted hydration of navy beans (*Phaseolus vulgaris*). *Ultrasonics Sonochemistry*, 21(1), 409-414.
- Goins, G. D., Yorio, N. C., Sanwo, M. M., Brown, C. S. (1997). Photomorphogenesis, photosynthesis, and seed yield of wheat plants grown under red light-emitting diodes (LEDs) with and without supplemental blue lighting. *Journal of experimental botany*, 48(7), 1407-1413.
- González, S., Fortes, D., Herrera, R. S. (2008). Efecto de diferentes dosis de radiación láser en la germinación de semillas de Kudzú (*Pueraria phaseoloides*). Nota técnica. *Revista Cubana de Ciencia Agrícola*, 42(1), 93-95.

- Hartmann, H.D.; Kester, D.E; Davies, F.T. 2014. Plant Propagation. Principles and practices. 8th ed. Pearson Education Limited, Edimburgh Gate, Harlow.
- Hirose, F., Inagaki, N., Hanada, A., Yamaguchi, S., Kamiya, Y., Miyao, A., Hirochika, H., Takano, M. (2012). Cryptochrome and phytochrome cooperatively but independently reduce active gibberellin content in rice seedlings under light irradiation. *Plant and cell physiology*, 53(9), 1570-1582.
- Hoffmann, F. (1996). Laser microbeams for the manipulation of plant cells and subcellular structures. *Plant Science*, 113(1), 1-11.
- ISTA. Reglas Internacionales para el Análisis de las Semillas. (2016).
- Jamil, Y., Perveen, R., Ashraf, M., Ali, Q., Iqbal, M.Y Ahmad, M. R. (2013). He-Ne laser-induced changes in germination, thermodynamic parameters, internal energy, enzyme activities and physiological attributes of wheat during germination and early growth. *Laser Physics Letters*, 10: 045606 (8 pp)
- Juan, M. (2017). Estudio para la mejora de las técnicas de propagación de la alcaparra (*Capparis spinosa* L.). Tesis doctoral, Universitat Politècnica de València.
- Kim, H. J., Feng, H., Kushad, M. M., Fan, X. (2006). Effects of ultrasound, irradiation, and acidic electrolyzed water on germination of alfalfa and broccoli seeds and *Escherichia coli* O157: H7. *Journal of food science*, 71(6), 168-173.)
- Krawiec, M., Dziwulska-Hunek, A., Kornarzyński, K. (2018). The use of physical factors for seed quality improvement of horticultural plants. *Journal of Horticultural Research*, 26(2), 81-94.
- Krawiec, M., Dziwulska-Hunek, A., Palonka, S., Kaplan, M., Baryla, P. (2016). Effect of laser irradiation on seed germination and root yield of scorzonera (*Scorzonera hispanica* L.). *Acta Agrophysica*, 23(4).
- Liu, J., Wang, Q., Karagić, Đ., Liu, X. V., Cui, J., Gui, J., Gu, M., Gao, W. (2016). Effects of ultrasonication on increased germination and improved seedling growth of aged grass seeds of tall fescue and Russian wildrye. *Scientific reports*, 6(1), 1-12.)
- López-Ribera, I., Vicient, C. M. (2017). Use of ultrasonication to increase germination rates of Arabidopsis seeds. *Plant Methods*, 13(1), 1-6.)
- Lozano Puche, J. (1977). *El alcaparro* (No. 19-77HD). Hojas divulgadoras. España. Ministerio de Agricultura.
- Luna Lorente, F., Pérez Vicente, M. (1985). *La tapenera o alcaparra; cultivo y aprovechamiento*. Madrid. España. Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación.
- Ma, F., Cholewa, E. W. A., Mohamed, T., Peterson, C. A., Gijzen, M. (2004). Cracks in the palisade cuticle of soybean seed coats correlate with their permeability to water. *Annals of Botany*, 94(2), 213-228.
- MAPA. Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación. (2021). Acceso: 13/06/2021. https://www.mapa.gob.es/es/ministerio/servicios/informacion/alcaparra_tcm30-102691.pdf
- Marín, L. (2016). Estudio de la influencia de diferentes longitudes de onda de luz LED en la germinación de una orquídea *Encyclia* sp. Trabajo Fin de Grado, Instituto latinoamericano de ciencias de la vida y la naturaleza.
- Matsuda, R., Ohashi-Kaneko, K., Fujiwara, K., Goto, E., Kurata, K. (2004). Photosynthetic characteristics of rice leaves grown under red light with or without supplemental blue light. *Plant and Cell Physiology*, 45(12), 1870-1874.
- Mehmet, Ö. N. E. R., YILDIRIM, A., Bayram, M. (2010). Modeling of water absorption of ultrasound applied chickpeas (*Cicer arietinum* L.) using Peleg's equation. *Journal of Agricultural Sciences*, 16(4), 278-286.

- Meisel, L., Urbina, D., Pinto, M. (2011). Fotorreceptores y respuestas de plantas a señales lumínicas. *Fisiología vegetal. FA Squeo Cardemil (eds), Ediciones Universidad de La Serena, Chile. Cap, 18, 1-10.*
- Moore, R.P. (1985). Manual de ensayos al tetrazolio. Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación, Madrid.
- Moreno-Jiménez, A. M., Loza-Cornejo, S., Ortiz-Morales, M. (2017). Efecto de luz LED sobre semillas de *Capsicum annum* L. var. serrano. *Bioteología Vegetal, 17(3).*
- Navarro Ramos, D. (2019). Influencia del manejo de las estaquillas de *Capparis spinosa* L. en su prendimiento. Trabajo Fin de Máster, Universitat Politècnica de València.
- Orozco-Segovia, A., Márquez-Guzmán, J., Sánchez-Coronado, M. E., Gamboa de Buen, A., Baskin, J. M., Baskin, C. C. (2007). Seed anatomy and water uptake in relation to seed dormancy in *Opuntia tomentosa* (Cactaceae, Opuntioideae). *Annals of Botany, 99(4), 581-592.*
- Özdemir, F.; Öztürk, M. (1996). Studies on the autecology of *Capparis* L. species distributed in West Anatolia. *Turkish Journal of Botany, 20(2):117-127.*
- Paniagua-Pardo, G., Hernández-Aguilar, C., Rico-Martínez, F., Domínguez-Pacheco, F. A., Martínez-Ortiz, E., Martínez-González, C. L. (2015). Efecto de la luz led de alta intensidad sobre la germinación y el crecimiento de plántulas de brócoli (*Brassica oleracea* L.). *Polibotánica, (40), 199-212.*
- Pascual, B., Pascual, N., San Bautista, A., y Castell, V. (2017). Propagación de plantas. Colección Apuntes. Universitat Politècnica de València, València.
- Pascual, B., San Bautista, A., Imbernón, A., López-Galarza, S., Alagarda, J., Maroto, J. V. (2004). Seed treatments for improved germination of caper (*Capparis spinosa*). *Seed Science and Technology, 32(2), 637-642.*
- Pascual, B., San Bautista, A., Pascual Seva, N., García Molina, R., López-Galarza, S., Maroto, J. V. (2009). Effects of soaking period and gibberellic acid addition on caper seed germination. *Seed Science and Technology, 37(1), 33-41.*
- Pascual, B.; San Baustista, A.; Ferreros, N.; Lopez Galarza, S.; Maroto, J.V. 2003. Analysis of germination of caper seeds as influenced by the position of fruit on the mother plant, fruit maturation stage and fruit weight. *Journal of Horticultural Science and Biotechnology, 78: 73–78.*
- Patero, T., & Augusto, P. E. (2015). Ultrasound (US) enhances the hydration of sorghum (*Sorghum bicolor*) grains. *Ultrasonics Sonochemistry, 23, 11-15)*
- Pepper, A. E., Seong-Kim, M. S., Hebst, S. M., Ivey, K. N., Kwak, S. J., Broyles, D. E. (2001). sh1, a new set of Arabidopsis mutants with exaggerated developmental responses to available red, far-red, and blue light. *Plant physiology, 127(1), 295-304.*
- Podleśny, J., Stochmal, A., Podleśna, A. Y Misiak, L. E. 2012. Effect of laser light treatment on some biochemical and physiological processes in seeds and seedlings of white lupine and faba bean. *Plant Growth Regulation, 67(3): 227-233.*
- Porto, C. L., Ziuzina, D., Los, A., Boehm, D., Palumbo, F., Favia, P., Tiwari, B., Bourke, P., Cullen, P. J. (2018). Plasma activated water and airborne ultrasound treatments for enhanced germination and growth of soybean. *Innovative Food Science & Emerging Technologies, 49, 13-19.*
- Ramírez, R., González, L. M., Camejo, Y., Zaldívar, N., Fernández, Y. (2006). Estudio de radiosensibilidad y selección del rango de dosis estimulantes de rayos X en cuatro variedades de tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill). *Cultivos Tropicales, 27(1), 63-67.*

- Ranjbari, A., Kashaninejad, M., Aalami, M., Khomeiri, M., Gharekhani, M. (2013). Effect of ultrasonic pre-treatment on water absorption characteristics of chickpeas (*Cicer arietinum*). *Latin American applied research*, 43(2), 153-159.
- Rhizopolou, S.; Loannidi, E.; Alexandredes, N.; Argirouopoulos, A. (2006). A study on functional and structural traits of the nocturnal flowers of *Capparis spinosa* L. *Journal of Arid Environments*, 66(4):635 - 647.
- Rong, H., Xunling, W., Ming, Y. 2002. Influence of He-Ne laser irradiation on the excision repair of cyclobutyl pyrimidine dimers in the wheat DNA. *Chinese Science Bulletin*, 47: 18-821.
- Soliman A., Harith M.A. 2010. Effects of laser stimulation on germination of *Acacia farnesiana* (L.) Willd. *Acta Horticulturae* 854: 41–49.
- Szajsner H., Drozd D., 2003. Feasibility of the pre-sowing biostimulation to increase the sowing value of spring barley cultivars (en Polaco). *Acta Agrophysica*, 98, 851-856.
- Tlili, N.; Walid, E.; Ezzeddine, S.; Abbel hamid, K.; Saida, T.; Nizar, N. (2011). The caper (*Capparis* L.): Ethno pharmacology, phytochemical and pharmacological properties. *Fitoterapia*, 82: 93-101.
- Torres, M., Frutos, G. (1990). Logistic function analysis of germination behaviour of aged fennel seeds. *Environmental and Experimental Botany*, 30(3), 383-390.

ANEXO 1: Espectro de las lámparas de diferentes longitudes de onda

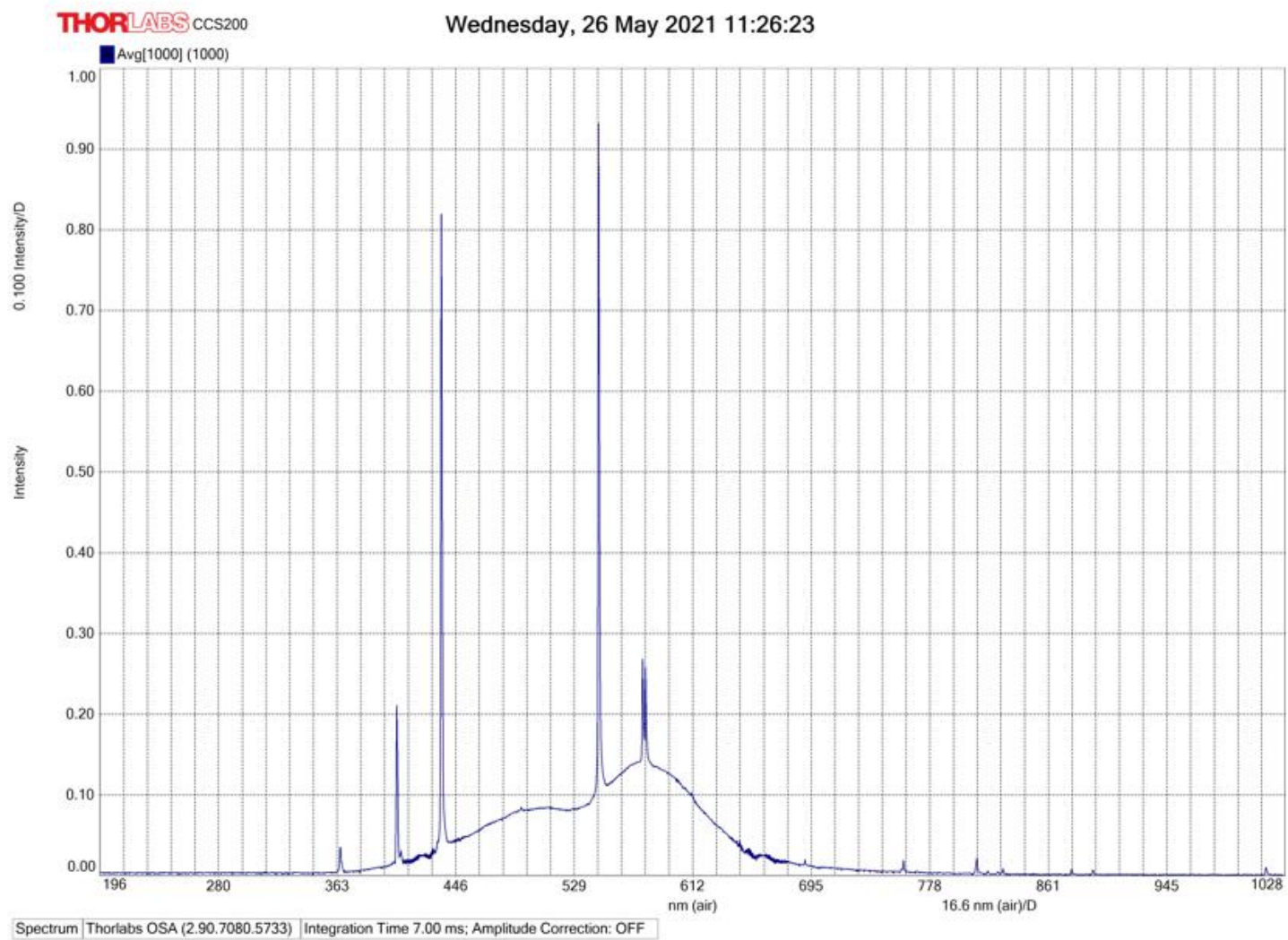


Figura A.11. Distribución del espectro de color de los tubos fluorescentes blancos.

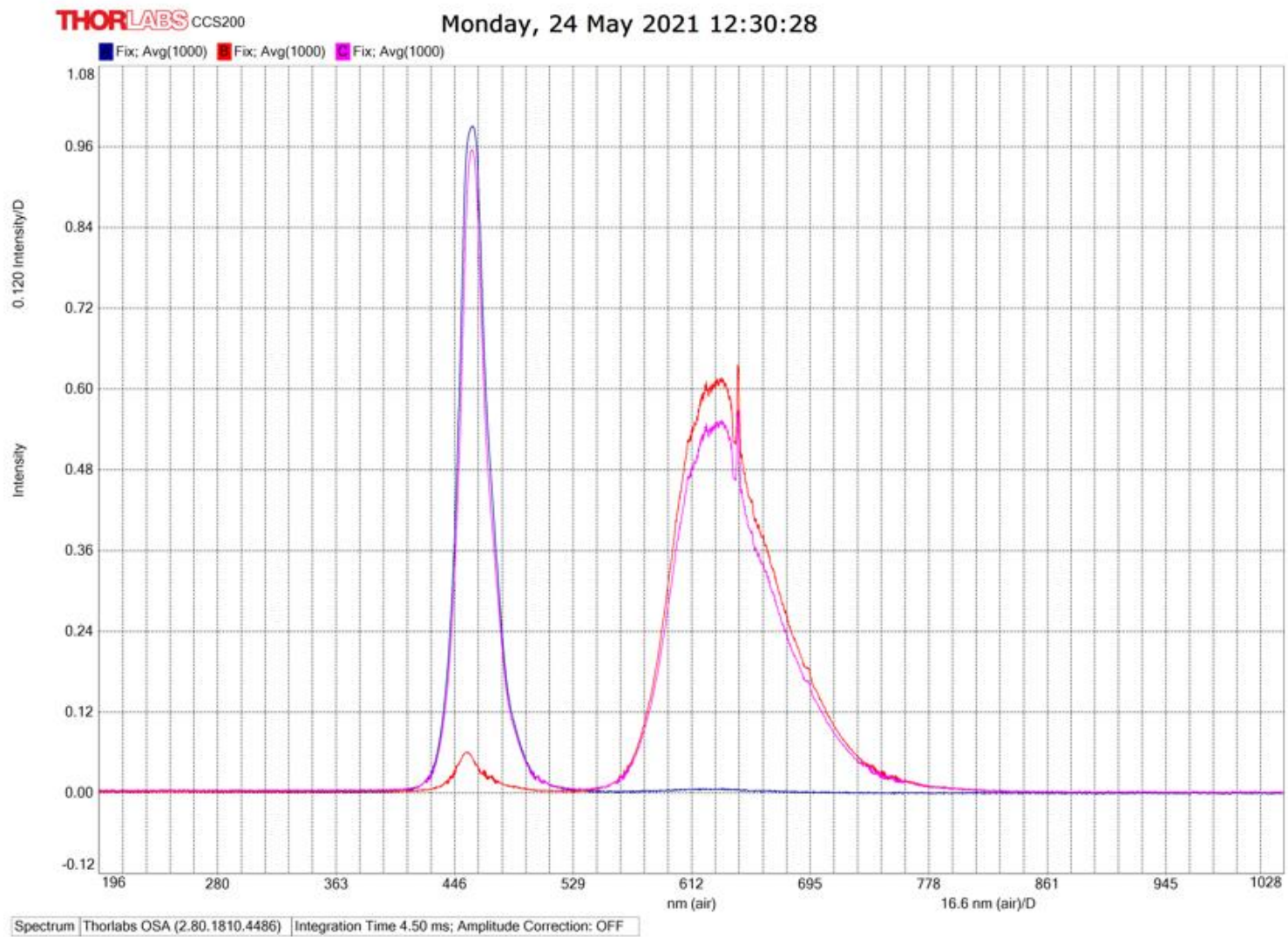


Figura A 1.2. Distribución del espectro de color de las tres lámparas LEDs, azul (línea de color azul), rojo (línea de color rojo) y rojo + azul (línea de color violeta).