

UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA

ESCOLA TÈCNICA SUPERIOR D'ENGINYERIA
AGRONÒMICA I DEL MEDI NATURAL



INFLUENCIA DE LA ESCARIFICACIÓN ENZIMÁTICA EN LA GERMINACIÓN DE SEMILLA DE ALCAPARRA

(Capparis spinosa L.)

Trabajo Fin de Máster

Presentado por:

Bolívar Alfredo Mantilla Paredes

Dirigido por:

Dra. D^a. Nuria Pascual Seva

VALENCIA, septiembre 2015

RESUMEN

La propagación sexual de la alcaparra (*Capparis spinosa* L.) presenta factores limitantes que limitan el normal proceso de germinación. El factor más influyente en la germinación es la dureza de sus cubiertas, lo que ha sido objetivo de diferentes estudios. Con el fin de reblandecer la cubierta, se han aplicado distintos tipos de escarificación de las semillas, entre los que la escarificación enzimática ha sido la menos ensayada hasta la fecha. Por esto, el objetivo de este trabajo, es evaluar la influencia de esta escarificación enzimática sobre la germinación de estas semillas. Para ello se realizaron dos experimentos. En el primer experimento se analizó el efecto de los complejos enzimáticos de *Trichoderma reesei* (CTR; 12.5%) y Driselasa (0.5%) y dos períodos de tiempo (60 y 120 horas) sobre la germinación de las semillas de alcaparra, manteniendo húmedo el sustrato con agua y ácido giberélico durante 90 días. Los mejores resultados de germinación se obtuvieron con el tratamiento con CTR y 120 horas. En el segundo experimento se ensayaron distintas concentraciones de CTR (6.25%, 12.5%, 18.75% y 25%), con duración de los tratamientos de 30 y 60 horas. Los mejores resultados en la germinación se obtuvieron con la duración de 60 horas, sin diferencias significativas entre las concentraciones de 18.75% y 25%.

De manera paralela, se realizó un estudio histológico de las semillas, en distintos estados de germinación, mediante el uso de binocular y microscopio electrónico de barrido.

Palabras clave: semillas, escarificación enzimática, *Trichoderma reesei*, Driselasa, histología

ABSTRACT

The sexual propagation of caper (*Capparis spinosa* L.) has limiting factors of the normal process of germination. The most limiting factor is the hardness of their covers, which has been the target of different studies. In order to soften the seed covers, different types of scarification, among which, the enzymatic scarification has been less studied. Therefore, the purpose of this work is to evaluate the influence of this enzymatic scarification on the germination of caper seeds. For this, two experiments were performed. In the first experiment, the effect of the enzyme complexes from *Trichoderma reesei* (CTR; 12.5%) and Driselasa (0.5%) and of two time periods (60 and 120 hours), on the germination of caper seeds were analyzed, maintaining the substrate wet with water and gibberellic acid for 90-day. The best results were obtained with the CTR treatment and 120 hours. In the second experiment different concentrations of CTR (6.25%, 12.5%, 18.75% and 25%) with treatment times of 30 and 60 hours were tested. The best results were obtained in the germination to 60 hours, without significant differences between the concentrations of 18.75% and 25%. In parallel, a histological study of the seeds at different stages of germination was performed, using binoculars and scanning electron microscope.

Keywords: seeds, enzymatic scarification, *Trichoderma reesei*, Driselase, histology.

AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Nuria Pascual, por la ayuda brindada en el desarrollo de este documento.

Al Profesor, Dr. Bernardo Pascual por la guía y orientación que supo ofrecerme durante el desarrollo de los experimentos.

Al Profesor, Mariano Juan, por su predisposición para responder mis inquietudes propias de un alumno que busca aprender.

A Antoine Fernández, por su colaboración y compañía durante la etapa fotográfica.

A Mary y Agustín por su apoyo incondicional.

ÍNDICE GENERAL

1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1 GENERALIDADES.....	1
1.2 SISTEMÁTICA	2
1.3 DESCRIPCIÓN BOTÁNICA	3
1.4 PROPAGACIÓN DE <i>Capparis spinosa</i>	6
1.4.1 Reproducción asexual	6
1.4.2 Multiplicación <i>in vitro</i>	6
1.4.3 Reproducción sexual	7
1.4.3.1 Estructura de la semilla.....	7
1.4.3.2 Germinación de la semilla	9
1.4.3.3 Latencia en la semilla	11
1.5 TRATAMIENTOS PARA MEJORAR LA GERMINACIÓN	13
1.5.1 Escarificación	14
1.5.1.1 Escarificación enzimática	15
1.5.2 Ácido giberélico	18
2. OBJETIVOS.....	19
3. MATERIAL Y MÉTODOS	19
3.1 EFECTO DE LOS COMPLEJOS ENZIMÁTICOS EN LA GERMINACIÓN DE LA SEMILLA DE <i>Capparis spinosa</i>.....	19
3.1.1 Efecto de los complejos enzimáticos <i>Driselasa</i> y <i>Trichoderma reesei</i>. 20	
3.1.2 Efecto de distintas concentraciones del complejo de <i>Trichoderma reesei</i>.....	22
3.1.3 Prueba topográfica al tetrazolio para semillas de alcaparra.....	23
3.2 DESCRIPCIÓN HISTOLÓGICA DE LA SEMILLA DE <i>Capparis spinosa</i>.	24

4. RESULTADOS y DISCUSIÓN	25
4.1 EFECTO DE LOS COMPLEJOS ENZIMÁTICOS EN LA GERMINACIÓN DE LA SEMILLA DE <i>Capparis spinosa</i>.....	25
4.1.1 Efecto de los complejos enzimáticos <i>Driselasa</i> y <i>Trichoderma reesei</i>.	25
4.1.2 Prueba topográfica al tetrazolio para semillas de alcaparra en el primer experimento	30
4.1.3 Efecto de distintas concentraciones del complejo de <i>Trichoderma reesei</i>.....	32
4.1.4 Prueba topográfica al tetrazolio para semillas de alcaparra en el segundo experimento	39
4.2 DESCRIPCIÓN HISTOLÓGICA DE LA SEMILLA DE <i>Capparis spinosa</i>.	41
5. CONCLUSIONES.....	46
6. REFERENCIAS	47

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1.1 Sistemática de la especie <i>Capparis spinosa</i> L.....	3
Tabla 3.1 Concentración y tiempo de escarificación de los complejos enzimáticos de <i>Trichoderma reesei</i> (CTR) y de Driselasa.....	20
Tabla 3.2 Concentración y tiempo de escarificación del complejo enzimático <i>Trichoderma reesei</i> (CTR) utilizado en el segundo experimento	23
Tabla 3.3 Equipos utilizados en los experimentos con semilla de <i>Capparis spinosa</i> ...	25
Tabla 4.1 Influencia de la escarificación enzimática (complejo enzimático), del tiempo de la escarificación (horas) y de la aplicación de AG, 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 ($k/2$, días ⁻¹), del primer experimento.....	28
Tabla 4.2 Análisis de las interacciones significativas de los análisis de la varianza de la tabla 4.1. E: Escarificación enzimática (complejo enzimático). T: Tiempo de la escarificación (horas). AG: Aplicación de AG. G(%): Germinación acumulada. A (%): Máximo porcentaje de germinación. t_{50} (β/k , días): Número de días necesarios para alcanzar el 50% de la germinación final. $k/2$ (días ⁻¹): Velocidad media relativa de germinación acumulada. Primer experimento.....	29
Tabla 4.3 Resultados de la prueba topográfica al tetrazolio de las semillas no germinadas tras la realización del ensayo de germinación en el primer experimento ...	32
Tabla 4.4 Influencia de la escarificación enzimática (diferentes concentraciones del complejo enzimático de <i>Trichoderma reesei</i>), del tiempo de la escarificación (horas) y de la aplicación de AG, 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 ($k/2$, días ⁻¹), del segundo experimento.....	35
Tabla 4.5 Análisis de las interacciones significativas de los análisis de la varianza de la tabla 4.3. C: Concentración del complejo enzimático de <i>Trichoderma reesei</i> . T: Tiempo de la escarificación (horas). AG: Aplicación de AG. G(%): Germinación acumulada. A (%): Máximo porcentaje de germinación. t_{50} (β/k , días): Número de días necesarios para alcanzar el 50% de la germinación final. $k/2$ (días ⁻¹): Velocidad media relativa de germinación acumulada. Segundo experimento. G(%): Germinación acumulada. A (%):	

Máximo porcentaje de germinación. t_{50} (β/k , días): Número de días necesarios para alcanzar el 50% de la germinación final. $k/2$ (días ⁻¹): Velocidad media relativa de germinación acumulada.....	36
Tabla 4.6 Contenido celulosa, hemicelulosa y lignina luego de la escarificación con <i>Trichoderma reesei</i> (CTR) a 30 y 60 horas.....	38
Tabla 4.7 Medición del contenido en sólidos solubles totales (SST) y coordenadas Hunter correspondientes a la coloración de la solución del complejo enzimático al finalizar la escarificación.....	38
Tabla 4.8 Resultados de la prueba topográfica al tetrazolio de las semillas no germinadas tras la realización del ensayo de germinación en el segundo experimento.	40

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.1 Semilla no endospermada mostrando al cotiledón como fuente sumidero de azúcares y aminoácidos. Fuente: Bewley y Black, 1994.....	11
Figura 1.2 Estructura molecular de la celulosa y sitios de acción de endoglucanasas, celobiohidrolasas y β –glucosidasas. Fuente: Kumar et al., 2008	15
Figura 1.3 Estructura química de hemicelulosa y objetivos de las enzimas hidrolíticas que intervienen en la degradación del polímero hemicelulósico. Fuente: Kumar et al., 2008	16
Figura 1.4 Estructuras que forman parte de la lignina. Fuente Hatakeyama y Hatakeyama, 2010	16
Figura 1.5 Complejo enzimático de <i>Trichoderma reesei</i> y su mecanismo de acción. Fuente: Sigma-Aldrich	17
Figura 1.6 Mecanismo de acción de Driselasa a través de la enzima xilanasa. Fuente: Sigma-Aldrich	17
Figura 1.7 Mecanismo de acción de Driselasa a través de la enzima laminaranasa. Fuente: Sigma-Aldrich	17
Figura 1.8 Mecanismo de acción de Driselasa por enzimas endoglucanasas, celobiohidrolasas y β -glucosidasas. Fuente: Sigma-Aldrich.....	18
Figura 4.1 Modelo logístico ajustado a la germinación acumulada correspondiente a los valores medios de los complejos enzimáticos. Primer experimento.	26
Figura 4.2 Modelo logístico ajustado a la germinación acumulada correspondiente a los valores medios de los tiempos de aplicación de los complejos enzimáticos. Primer experimento.....	26
Figura 4.3 Modelo logístico ajustado a la germinación acumulada correspondiente a los valores medios de los tiempos de aplicación de ácido giberélico (AG). Primer experimento.	27
Figura 4.4 Modelo logístico para el primer experimento ajustado a la germinación acumulada correspondiente a los valores medios de la interacción de los complejos enzimáticos y el tiempo de escarificación.	27
Figura 4.5 Modelo logístico ajustado a la germinación acumulada correspondiente a los valores medios de las concentraciones para el complejo enzimático <i>Trichoderma reesei</i> . Segundo experimento.	33

Figura 4.6 Modelo logístico para el segundo experimento ajustado a la germinación acumulada correspondiente a los valores medios de los tiempos de aplicación del complejo enzimático <i>Trichoderma reesei</i> . Segundo experimento	33
Figura 4.7 Modelo logístico para el segundo experimento ajustado a la germinación acumulada correspondiente a los valores medios obtenidos con la aplicación de ácido giberélico. Segundo experimento.	34
Figura 4.8 Modelo logístico para el segundo experimento ajustado a la germinación acumulada correspondiente a los valores medios de la interacción de las concentraciones y el tiempo de escarificación. Segundo experimento.	34
Figura 4.9 Contenido de sólidos solubles totales de la solución del complejo <i>Trichoderma reesei</i> al finalizar la escarificación	39
Figura 4.10 Valor de Croma medido en la solución del complejo <i>Trichoderma reesei</i> al finalizar la escarificación.....	39

ÍNDICE DE FOTOGRAFÍAS

Fotografía 1.1 Arbusto perenne, característico de <i>Capparis spinosa</i>	3
Fotografía 1.2 Hojas gruesas, verdes y de consistencia crasa en <i>Capparis spinosa</i>	4
Fotografía 1.3 Flor abierta, tetrámera y con largos estambres distintivo de <i>Capparis spinosa</i> 4	
Fotografía 1.4 Baya de <i>Capparis spinosa</i> con forma oval y largo pedúnculo	5
Fotografía 1.5 Fruto maduro y abierto de <i>Capparis spinosa</i>	5
Fotografía 3.1 Semillas teñidas con tetrazolio: (A) Semillas viables y (B) semillas inviables, observadas a 13 aumentos con lupa marca Euromex	24
Fotografía 4.1 Semillas teñidas con tetrazolio: (1) Semillas viables, (2) y (3) semillas viables con bajo vigor y (4) semillas inviables, observadas a 13 aumentos con lupa marca Euromex	31
Fotografía 4.2 Vista exterior de semilla madura de <i>Capparis spinosa</i> observado a 12.5 aumentos con lupa marca Leica.....	41
Fotografía 4.3 Presencia del hilo en la cubierta de <i>Capparis spinosa</i> observado a 80 aumentos con lupa marca Leica.....	41
Fotografía 4.4 Corte longitudinal de la cubierta de alcaparra observado a 8 aumentos con lupa marca Leica.....	42
Fotografía 4.5 Corte longitudinal de la cubierta de alcaparra observado a 80 aumentos con lupa marca Leica.....	42
Fotografía 4.6 Corte longitudinal de la cubierta de alcaparra observado a 500 aumentos con microscopio electrónico de barrido marca JEOL	43
Fotografía 4.7 Corte longitudinal en semillas maduras y secas de alcaparra observado a 13 aumentos con lupa marca Euromex.....	43
Fotografía 4.8 Cotiledones, hipocótilo, radícula y parte de la envoltura del embrión de alcaparra observado a 8 aumentos con lupa marca Leica.....	44
Fotografía 4.9 Envoltura del embrión que corresponde al meso y endotegmen observado a 12.5 aumentos con lupa marca Leica	44
Fotografía 4.10 Cotiledones, hipocótilo, radícula y envoltura del embrión observado a 10 aumentos con lupa marca Euromex.....	45

Fotografía 4.11 Cotiledones y envoltura del embrión observado a 12.5 aumentos con lupa marca Leica..... 45

1. INTRODUCCIÓN

1.1 GENERALIDADES

La alcaparra (*Capparis spinosa* L.) también conocida como tapanera es una planta arbustiva caducifolia de ramas rastreras, cuyo origen basándose en la aparición de botones de flores y frutos inmaduros carbonizados en Siria que datan alrededor del 2400 a 1400 antes de Cristo (Tlili et al., 2011), se remonta al Mesolítico inferior.

Actualmente los países que lideran el comercio internacional de alcaparras son Marruecos y Turquía, siendo la producción marroquí beneficiada por el aporte de tecnología y experiencia que España entregó en este país, debido a que los costes de mano de obra aumentaron en el País Ibérico. Es importante resaltar la posición de España en el flujo de comercio internacional que pese a disponer de menos superficie cultivada en su territorio ha logrado mantener su presencia comercial, asociado estratégicamente con Marruecos como base de operaciones en la producción de alcaparra (Costa y Rossi, 2005).

La mayoría de especies de la familia Capparaceae contienen compuestos biológicamente activos como flavonoides, glucosinolatos, glucósidos, compuestos de amonio cuaternario, poliprenoles y alcaloides (Sarragiotto et al., 2004; Arslan et al., 2010; Bektas et al., 2012; Argentieri et al., 2012). Es así que del género *Capparis*, se aprovecha la totalidad de las partes vegetativas de la planta como materia prima para los sectores agroindustrial y farmacológico.

En un estudio con raíces de *Capparis zeylanica* se obtuvo el ácido graso octadec-7-en5-ynoic sobre el cual se evaluó su actividad antibacteriana inhibiendo el desarrollo de *Bacillus subtilis* y *Shigella dysenteriae* (Haque et al., 2004; Haque et al., 2008). Del sistema radical de *Capparis spinosa* L. se obtuvieron alcaloides de espermidina, cuya molécula está relacionada con la capacidad de reparar el proceso natural de deterioro y necrosis celular (Xiao et al., 2008).

Las investigaciones sobre esta especie abordan a los frutos, de los cuales se obtuvieron alcaloides con efecto hepatoprotector al mejorar la circulación del hígado (Yang et al., 2010).

En otro estudio, se examinó el efecto del extracto de estos frutos sobre el metabolismo lipídico en ratas diabéticas obteniéndose una disminución significativa de los niveles de triglicéridos en el plasma (Eddouks et al., 2005).

Con fines para uso agrícola, se obtuvo el extracto del tallo de *Capparis spinosa* para el control de nemátodos de la especie *Meloidogyne incognita* en estado juvenil (J2) con un valor de EC₅₀ (concentración de materia activa necesaria para reducir el crecimiento del patógeno un 50% respecto al control) de 3 días de inmersión con 215 mg L⁻¹ del extracto (Caboni et al., 2012).

La actividad fitotóxica de las hojas de *Capparis spinosa* fue aprovechada como bioherbicida para inhibir la germinación y crecimiento en *Lactuca sativa* L, *Raphanus sativus* y dos especies arvenses *Silybum marianum* L. y *Pegnum harmala* L. produciéndose el 75.5% de inhibición sobre el citado material vegetal (Ladhari et al., 2013). Dado el interés que ha despertado el cultivo de la alcaparra y sobre todo la demanda del producto en el mercado exterior en los últimos años, varios investigadores relacionados con este cultivo mediterráneo han desarrollado ensayos enfocados a mejorar la germinación de la semilla, que presenta al igual que el resto de especies de este género, una semilla con un tegumento duro que impide el libre ingreso de agua y oxígeno para su germinación, lo que ha motivado a ciertos investigadores la identificación de procesos físicos, químicos y biológicos relacionados con la germinación de la alcaparra.

1.2 SISTEMÁTICA

La familia Capparaceae y el género *Capparis* tienen un gran número de especies, siendo importantes en regiones tropicales como plantas medicinales. En la Cuenca del Mediterráneo se han extendido dos especies de alcaparras, *Capparis spinosa* L. y *Capparis ovata* Desf, siendo las dos únicas especies existentes en Europa con un valor económico en sistema de producción extensivo (Melgarejo, 2000). La familia Capparidaceae, con cáliz de cuatro sépalos y corola de cuatro pétalos, tiene alrededor de 800 especies y 45 géneros; a esta familia pertenece la alcaparra, encontrándose el género *Capparis* que tiene más de 350 especies propias de climas tropicales y subtropicales (Melgarejo, 2000)

Tabla 1.1 Sistemática de la especie *Capparis spinosa* L.

División	Fanerógamas
Subdivisión	Angiospermas
Clase	Dicotiledóneas
Subclase	Magnoliópsida
Orden	Brassicales
Familia	Capparaceae
Género	Capparis
Especie	<i>C. spinosa</i> L.

1.3 DESCRIPCIÓN BOTÁNICA

Es 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 3 metros de longitud en las plantas cultivadas.



Fotografía 1.1 Arbusto perenne, característico de *Capparis spinosa*

Las hojas, algo gruesas, verdes y de consistencia crasa, son de forma más o menos oval, alternas y enteras, con un corto pecíolo de cuya base parten apéndices transformados en espinas más o menos curvadas y de consistencia leñosa.



Fotografía 1.2 Hojas gruesas, verdes y de consistencia crasa en *Capparis spinosa*

Las flores, de cuatro a cinco centímetros de diámetro, nacen en las axilas de las hojas, son tetrámeras con los pétalos blancos o ligeramente rosados. En su interior se encuentra una gran multitud de estambres de largos filamentos de color violáceo y con anteras amarillas. El ovario está sosteniendo en una columnilla (ginóforo) que es una prolongación del eje floral.



Fotografía 1.3 Flor abierta, tetrámera y con largos estambres distintivo de *Capparis spinosa*

El fruto, en baya con un largo pedúnculo, es coriáceo y carnoso en su interior. Tiene forma ovalada muy pronunciada en la inserción y algo más ensanchado en el ápice, llegando a alcanzar de dos a cuatro centímetros de longitud, según variedad y

procedencia. Su color, cambia de verde cuando es joven a rojizo en la madurez y es conocido con el nombre de caparrón o alcaparrón. Las semillas son reniformes, de dos a tres milímetros en su dimensión máxima y toman un color marrón oscuro cuando llegan a la madurez. La raíz es medianamente ramificada, gruesa, fuerte y muy profunda (Luna y Pérez, 1985).



Fotografía 1.4 Baya de *Capparis spinosa* con forma oval y largo pedúnculo



Fotografía 1.5 Fruto maduro y abierto de *Capparis spinosa*

1.4 PROPAGACIÓN DE *Capparis spinosa*

1.4.1 Reproducción asexual

Entre los métodos utilizados para la multiplicación vegetativa del género *Capparis*, destacan, la multiplicación por estaquilla, habiéndose desarrollado en los últimos años, estudios fisiológicos con diferentes especies leñosas donde se evaluaron el uso de fitorreguladores en diferentes estados fenológicos para medir el proceso de rizogénesis de dicho material vegetal con el fin de mejorar la capacidad reproductiva en estas especies (Melgarejo, 2000; Latsague et al., 2008).

La multiplicación por estaquilla leñosa se realiza con ramos vigorosos, lignificados, sin hojas, obtenidos al final del período vegetativo con longitud de 15 cm y diámetro superior a 5 mm, realizando el corte debajo del nudo. Las estaquillas previamente desinfectadas, deben conservarse en un ambiente húmedo a 4-5°C conservados en cámara frigorífica. La multiplicación por estaquilla herbácea se realiza a partir de las yemas de la cepa que brotan a finales de marzo de las cuales se obtienen tallos de 5-10 cm de longitud, sin brotaciones laterales. Para realizar la plantación, se debe enterrar casi la totalidad de la estaquilla, dejando al exterior sólo una hoja o varias hojas pequeñas en el caso de las apicales (Melgarejo, 2000)

Diferentes ensayos en especies leñosas con estaquillado sugieren el tratamiento con la auxina ácido indolbutírico, ya que favorece la formación de raíces adventicias (Latsague et al., 2009). La formación de raíces adventicias ha sido evaluada a través de la medición de los niveles endógenos de ácido indolacético y ácido abscísico como las sustancias implicadas en el proceso de estimulación e inhibición de raíces adventicias (Blakesley et al., 1991).

1.4.2 Multiplicación *in vitro*

El cultivo de tejidos vegetales para la multiplicación clonal se ha constituido en una alternativa para la propagación vegetativa. Este método denominado micropropagación se basa en la obtención de nuevas plántulas a partir de un explante.

Las técnicas de multiplicación *in vitro* son muy utilizadas para la obtención de material vegetal libre de patógenos en especies de propagación vegetativa (Fernández et al., 2008).

Las técnicas de multiplicación *in vitro* han sido utilizadas a partir de yemas axilares en plántulas del género *Capparis* desarrolladas en diferentes ensayos, en los cuales se establece el procedimiento *in vitro* para la propagación así como los protocolos de conservación (Tyagi y Kothari, 1997; Al-Safadi y Elias, 2011; Al-Mahmood et al., 2012; Carra et al., 2012; Saifi et al., 2013).

La importancia de disponer de medios de cultivo radica en la capacidad que tienen estas soluciones para suministrar macronutrientes, micronutrientes, fuente de carbono, aminoácidos, reguladores de crecimiento y antioxidantes hacia los tejidos vegetales que se desarrollarán bajo estas técnicas de multiplicación *in vitro*. Es así que el medio de Murashige y Skoog (MS) presentó el mayor porcentaje de enraizamiento, evidenciado por Carra et al., (2012) en cuya investigación de multiplicación *in vitro* de *Caparis spinosa* a partir del estigma, anteras y óvulos no fertilizados.

En un estudio de germinación y desarrollo de la plántula *in vitro* en *Capparis spinosa*, realizado por Germanà y Chiancone (2009) se evaluaron algunos tratamientos con el fin de determinar los factores que pudieran romper la latencia y mejorar la germinación de la semilla para en una segunda fase evaluar en condiciones *in vitro* el desarrollo de la plántula. El ensayo llega a concluir que los mejores tratamientos fueron, la escarificación mecánica y un pre-tratamiento en agua a 40°C por una hora, antes del desarrollo *in vitro* de la plántula.

1.4.3 Reproducción sexual

1.4.3.1 Estructura de la semilla

La propagación por semillas es uno de los principales métodos de reproducción de las plantas y uno de los más eficientes y utilizados en la propagación de plantas cultivadas. La semilla constituye el producto final del proceso de crecimiento y desarrollo efectuado en la planta progenitora (Hartmann et al, 2002)

La semilla procede del desarrollo del óvulo y el origen de sus distintas partes se corresponde con las distintas partes y tejidos del óvulo de la flor, es así que la estructura básica de la semilla de las angiospermas consta de cuatro componentes (Besnier, 1989):

- El embrión, que procede del cigoto formado por la unión de la oosfera con una de las células generativas del tubo polínico; normalmente, el embrión es diploide y existe siempre en las semillas viables.
- El endospermo, que procede de la unión de los núcleos polares con la segunda célula generativa del tubo polínico. El endospermo es triploide o poliploide; puede formar la mayor parte de las reservas nutritivas, quedar reducido a una sola capa de células o ser reabsorbido.
- El perispermo, que procede del desarrollo de la nucela; es diploide y tiene la misma constitución genética que la planta madre. Generalmente el perispermo queda reducido o es reabsorbido poco después de iniciar su desarrollo pero en algunas especies es anatómicamente identificable y, en otras, forma la principal reserva de sustancias nutritivas.
- Las cubiertas, que constan de dos partes bien diferenciadas: una es la testa, que procede del desarrollo de los tegumentos del óvulo y que salvo excepciones existe siempre, siendo diploide y de origen materno; la otra parte está constituida por las cubiertas exteriores, que proceden de orígenes diversos (frutos, glumillas, etc) y que faltan en las semillas que lo son en pleno sentido botánico.

Besnier (1989) señala que la mayoría de las especies de leguminosas poseen cubiertas que presentan una gran resistencia a la abrasión y que son impermeables al agua, estos elementos de juicio se ajustarían a características generales que presenta la cubierta de alcaparra, en tal virtud; la estructura de la testa parece depender, principalmente, de la impregnación de las células en empalizada con diversos compuestos químicos hidrófobos. En las semillas de leguminosas la penetración del agua se hace, fundamentalmente a través de la chalaza, que constituye un punto débil en la capa de células en empalizada y donde se desarrollan fácilmente grietas que permiten la penetración del agua.

De las restantes estructuras patentes en la superficie de la testa, el micrópilo suele estar completamente ocluido, mientras el hilo funciona como una válvula que se abre en ambiente seco, contribuyendo a la desecación de las semillas y a la dureza de la cubierta y cerrándose en ambiente húmedo.

Naturalmente, el agua puede entrar a través de la testa si en ésta se forman grietas por causas mecánicas (abrasión, temperaturas oscilantes, etc) o químicas (tratamiento con ácidos fuertes, como el paso a través del intestino de los animales) o si, a largo plazo, se degrada por descomposición microbiana.

Corner (1976) describe algunas características de la familia Capparaceae, señalando que estas semillas poseen exotegmen fibroso y presencia de estomas en la testa, teniendo ésta, de dos a seis células de espesor, por lo general no multiplicativo en las semillas pequeñas. El tegumento externo se presenta como una empalizada desigual de células cilíndricas con paredes más o menos espesas; el tegumento interno más o menos lignificado con paredes fibrosas, al menos la pared tangencial interior, formando eventualmente una película interna blanca. Perispermo muchas veces persistente como una simple capa de células. Endospermo persistente, con 1-6 capas de células.

1.4.3.2 Germinación de la semilla

La germinación comienza cuando en la semilla aletargada o en reposo, se activa la maquinaria bioquímica conservada y se desencadenan los procesos metabólicos. La terminación de la germinación coincide con la iniciación de la actividad fotosintética, lo que altera totalmente el metabolismo de la plántula nacida de la semilla (Besnier, 1989).

La iniciación de la germinación requiere que se cumplan tres condiciones (Hartmann et al., 2002):

- La semilla debe ser viable; esto es, el embrión debe estar vivo y ser capaz de germinar.
- La semilla no debe estar en letargo ni el embrión quiescente. No debe existir barreras fisiológicas o físicas que induzcan letargo, ni barreras químicas para la germinación.
- La semilla debe estar expuesta a las condiciones ambientales apropiadas.

Etapas de la germinación

El proceso de germinación puede dividirse en varias etapas consecutivas separadas pero que se traslapan.

Primera etapa.- denominada *imbibición de agua*, está relacionada con la diferencia de potencial hídrico existente entre la semilla y el sustrato húmedo sobre las que se encuentran. Es un fenómeno puramente físico que también tiene lugar en las semillas muertas o aletargadas y va acompañada por desprendimiento de calor (Besnier, 1989).

La actividad de las enzimas empieza muy rápidamente después del inicio de la germinación, a medida que se hidrata la semilla. La activación resulta en parte de la reactivación de enzimas previamente almacenadas que se formaron durante el desarrollo del embrión y en parte de la síntesis de nuevas enzimas al comenzar la germinación, que implica dos pasos básicos, uno de ellos es la transcripción de instrucciones genéticas del ADN para formar moléculas específicas de ARN mensajero. El segundo paso consiste en la traducción de esta información por medio de otro grupo de moléculas de ARN de transferencia para sintetizar proteínas específicas.

El primer signo visible de la germinación es la emergencia de la radícula, la cual resulta de la elongación de las células más bien que de división celular y este fenómeno se considera el final de la primera etapa (Hartmann et al., 2002).

Segunda etapa.- una vez que los mecanismos de respiración y de síntesis de proteínas y de ácidos nucleicos se han puesto en marcha de manera normal, momento que más o menos coincide con la ruptura de la cubierta por la radícula, comienza la segunda etapa de la germinación en la cual se da la movilización de reservas y crecimiento de la plántula (Besnier, 1989).

Jacobs (1960) describe ampliamente la familia *Capparaceae* señala entre otros detalles que las semillas del género *Capparis* son pobres en endospermo, lo que indica que el embrión acumula las sustancias de reserva en los cotiledones, denominadas así como semillas no endospermadas y al ser semillas con germinación epigea (Besnier, 1989) los cotiledones toman un color verde tras la nascencia y se vuelven fotosintéticos, por lo que a partir de ese momento, funcionan en parte como hojas y en parte como depósitos de reserva. Este proceso metabólico está descrito por Bewley y Black (1994) (Figura 1.1) en nacencia epigea en la cual describen este proceso metabólico señalando que los cotiledones constituyen la fuente de azúcares y aminoácidos que son desplazados hacia el hipocótilo (sumidero).

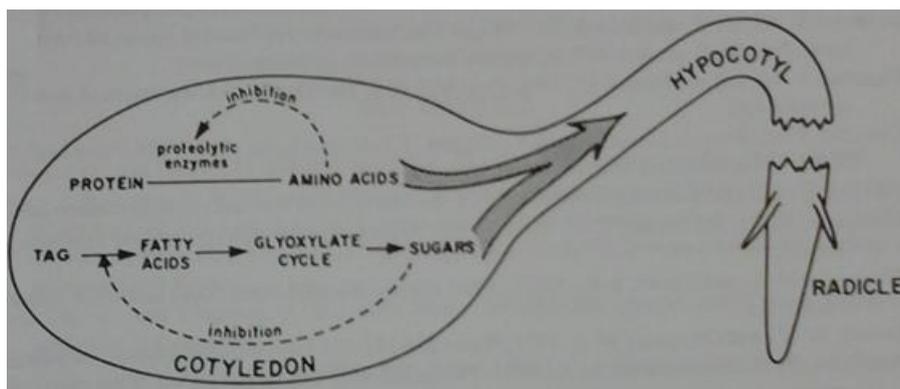


Figura 1.1 Semilla no endospermada mostrando al cotiledón como fuente sumidero de azúcares y aminoácidos. Fuente: Bewley y Black, 1994

Varios trabajos desarrollados para mejorar la germinación de las semillas de alcaparra se han venido efectuando en el Departamento de Producción Vegetal de la Universitat Politècnica de València en los cuales se señala que la germinación de las semillas de alcaparra es irregular, lo que puede deberse, en parte, a la presencia de una cubierta muy dura e impermeable al agua (Pascual et al., 2009). Ello motivó a estudiar la influencia de diferentes tratamientos para romper la dureza seminal a través de la escarificación mecánica con papel de lija, ultrasonidos, con ácido sulfúrico, con agua caliente, enzimática y remojo en agua, así mismo se evaluó la aplicación al sustrato de nitrato potásico, de ácido giberélico (AG) y el remojo previo a la siembra de las semillas en AG con el fin de romper la latencia fisiológica, concluyendo que la escarificación ácida seguida de la adición de AG al sustrato fue el mejor tratamiento para la germinación, con porcentajes cercanos al 100% (Pascual et al., 2004).

1.4.3.3 Latencia en la semilla

Una semilla viable (y, por tanto, viva) puede no germinar incluso aunque se den todas las condiciones ambientales necesarias para el crecimiento, a este fenómeno se denomina latencia de la semilla, retrasando el proceso de germinación y proporcionando a la semilla tiempo adicional para que pueda ser dispersada a grandes distancias, además incrementa la supervivencia de las plántulas al evitar la germinación en condiciones desfavorables. Se pueden definir dos tipos de latencia: la que induce la cubierta y la del embrión (Taiz y Zeiger, 2006).

Latencia impuesta por la cubierta.- existen cinco mecanismos básicos de latencia o dormición impuesta por la cubierta (Taiz y Zeiger, 2006):

- Prevención de la incorporación de agua
- Constricción mecánica.- debido a que la cubierta de la semilla puede ser demasiado rígida como para que la radícula pueda traspasarla.
- Interferencias para el intercambio gaseoso.- la reducida permeabilidad de las cubiertas de las semillas al oxígeno sugiere que dicha cubierta inhibe la germinación al limitar el aporte de oxígeno al embrión.
- Retención de inhibidores.- la cubierta de la semilla puede evitar la pérdida de inhibidores desde ésta.
- Producción de inhibidores.- las cubiertas de las semillas y los pericarpios pueden contener concentraciones relativamente altas de inhibidores del crecimiento, incluido el ABA, que pueden suprimir la germinación del embrión.

Latencia del embrión.- se cree que la dormición del embrión es debida a la presencia de inhibidores, especialmente ABA, así como la ausencia de promotores del crecimiento, como AG. La pérdida de la latencia del embrión suele estar asociada al descenso brusco de la relación entre ABA y AG.

Los diferentes tipos de semillas latentes se pueden clasificar según el tiempo de inicio de la dormición, más que por la causa de ésta (Taiz y Zeiger, 2006):

- Las semillas que se separan de la planta en un estado latente se dice que presentan latencia primaria.
- Las semillas que se separan de la planta en un estado No durmiente, pero que llegan a ser durmientes si las condiciones de germinación son desfavorables, muestran dormición secundaria.

-

En un estudio sobre mejora en la germinación de semilla de *Capparis spinosa* L. se señala que hay básicamente dos tipos de latencia que involucra diferentes mecanismos, por un lado la latencia del embrión y la inactividad con la que la testa se impone.

En opinión de Sozzi y Chiesa (1995) es poco probable que la incapacidad de las semillas de alcaparra para germinar sea debido a la latencia embrionaria, debido a que se han realizado pequeños cortes y pinchazos sobre la cubierta de la semilla, resultando medidas eficaces para estimular la germinación de alcaparras.

A través de varios ensayos relacionados con la latencia provocada por la dureza de las cubiertas y la germinación de semillas del género *Capparis*, (Pascual et al., 2006; Pascual et al., 2009) llegaron a concluir que no existe un mecanismo único para romper el letargo en las semillas, señalando que el equilibrio entre sustancias estimuladores (giberelinas y citoquininas) versus las sustancias inhibidoras (ácido abscísico), es probablemente una de las causas de la latencia, así como la luz y las bajas temperaturas indican sobre la producción de giberelinas o sobre el cambio en las membranas celulares facilitando la acción de las giberelinas. Además consideran que la activación de los fenómenos de respiración a través del ciclo de fosfato de pentosa, da lugar a la ruptura de la latencia.

1.5 TRATAMIENTOS PARA MEJORAR LA GERMINACIÓN

El bajo nivel de germinación de semillas del género *Capparis* ha motivado diferentes ensayos por parte de investigadores que buscan identificar las condiciones y factores que permitan disponer de un tratamiento adecuado para la germinación de esta especie, es así que Sozzi y Chiesa (1995) evaluaron diferentes tratamientos para romper la latencia en semillas de *Capparis spinosa* obteniendo el mayor porcentaje de germinación al utilizar ácido sulfúrico concentrado. En un segundo tratamiento evaluaron el remojo de la semilla en 100 mg L⁻¹ de AG durante 90 minutos y finalmente la adición de 0.2% de nitrato de potasio al sustrato de germinación.

En Irán fue evaluada la germinación de semillas de *Capparis spinosa* con la aplicación de ácido sulfúrico durante 30 minutos seguido por una inmersión de las semillas 400 mg L⁻¹ de AG (Bahrani et al., 2008).

En Kuwait, Suleiman et al., (2009) escarificaron semillas de *Capparis spinosa* con 1% de ácido sulfúrico durante 20 minutos seguido de 0.04% de AG y una semana en refrigeración (4°C) como el más efectivo tratamiento para romper la latencia.

En España, Pascual et al., (2004) analizaron el efecto de siete tratamientos para la eliminación de la dureza seminal y cuatro tratamientos para romper la latencia fisiológica de semillas de alcaparra (*Capparis spinosa*) concluyendo que la escarificación ácida seguida por la adición de una solución de AG al sustrato de germinación fue el mejor método, además de eficiente y rentable para asegurar la germinación de semillas de manera satisfactoria. Indican que la escarificación ácida

puede ser sustituida por la escarificación mecánica con ultrasonidos, la escarificación con agua caliente o del remojo, pero estos procedimientos requieren períodos de germinación más prolongados para llegar a niveles de germinación satisfactorios. El método de remojo de semillas, resultó bastante útil para retirar la dureza seminal.

1.5.1 Escarificación

La escarificación de semillas constituye un procedimiento abrasivo sobre la cubierta exterior de la semilla para favorecer el contacto entre el endospermo con el aire y agua. Especial interés muestran especies vegetales de ecosistemas semi-áridos que presentan cubiertas endurecidas, ante lo cual, la propia naturaleza presenta factores bióticos y abióticos que producen escarificación de las semillas como la temperatura (fuego o frío); cambios en el ambiente químico es decir, la ingestión de semillas por animales frugívoros y su paso a través del tracto digestivo o la abrasión mecánica del endocarpio a través de arena o rocas en los cursos de agua (Vilela y Raveta, 2001)

Una serie de estudios se han venido desarrollando con el género *Capparis* señalando diferentes técnicas de escarificación de la semilla con el fin de mejorar el proceso de germinación. Sozzi y Chiesa (1995) ensayaron diferentes pre-tratamientos químicos de escarificación, obteniendo a los 30 días de incubación cerca del 70% de germinación al someter a las semillas de *Capparis spinosa* L. con ácido sulfúrico concentrado por 20 minutos como pre-tratamiento para luego remojar las semillas en una solución de 100 mg L⁻¹ de AG durante 90 minutos. Este ensayo concluye señalando que la latencia es inducida por las estructuras que forman parte de la cubierta de la semilla.

En un ensayo que busca el mejor tratamiento para la germinación de semillas de *Capparis spinosa*, (Pascual et al., 2004) prueban dos tratamientos, el uno para remover la dureza seminal utilizando medios físicos y químicos y el otro tratamiento que busca romper la latencia fisiológica. Al finalizar el ensayo se observa que al cabo de 100 días como período de germinación, el mejor resultado para el primer tratamiento se obtuvo a través de la escarificación ácida con 68% mientras que en el segundo tratamiento se obtuvo el 90% al aplicar una solución de 500 mg L⁻¹ de AG al sustrato. Al tenor de estos resultados, el ensayo concluye señalando que el hecho de que existan diferencias en los resultados de las pruebas de germinación, demuestran que las semillas de alcaparras No fueron sensibles a la aplicación de AG cuando han sido previamente escarificadas, pero

también sin escarificación previa, contradiciendo lo que se ha reportado por Sozzi y Chiesa, (1995). Concluyendo de esta forma, que el control de la germinación de las semillas de alcarras no sólo reside en la cubierta de la semilla (latencia física), siendo probablemente sea debido a una latencia fisiológica.

1.5.1.1 Escarificación enzimática

La celulosa es un compuesto homopolisacárido compuesto por unidades de β - D – glucopiranosas unidas por enlaces glucosídicos β -(1 \rightarrow 4). Existen tres grandes grupos de las enzimas hidrolizantes de la celulosa (celulasas): endoglucanasas, celobiohidrolasas y β -glucosidasas que producen oligosacáridos, celobiosa y glucosa. El mecanismo de acción enzimático se inicia con las enzimas endoglucanasas que hidrolizan aleatoriamente los enlaces β -1,4 –glucosídicos dentro de la molécula de celulosa, favoreciendo el acceso a las enzimas celobiohidrolasas al disminuir el tamaño de las cadenas. Estas enzimas hidrolizan las moléculas de celulosa desde los extremos no reductores produciendo celobiosa, finalmente la β -glucosidasa hidroliza celobiosa en glucosa como se aprecia en la figura 1.2 (Kumar et al., 2008).

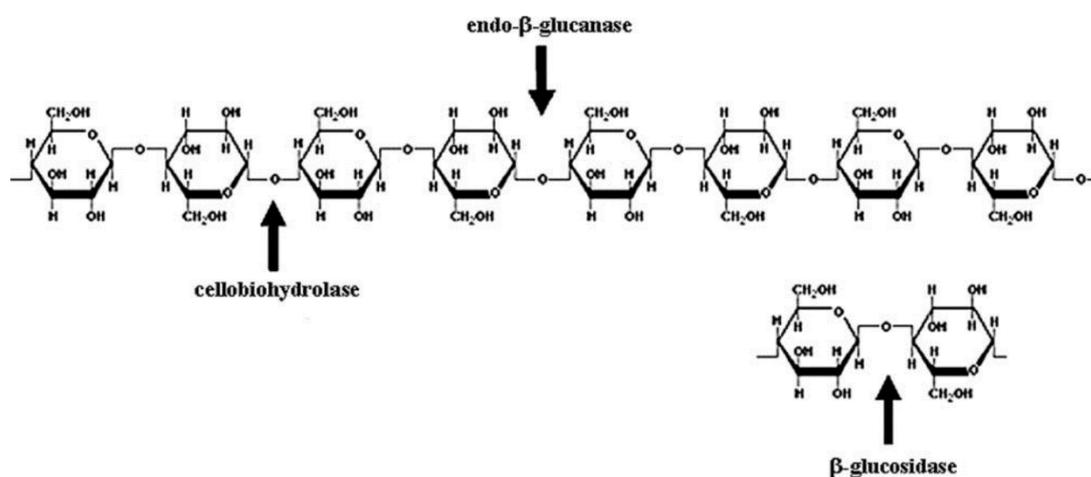


Figura 1.2 Estructura molecular de la celulosa y sitios de acción de endoglucanasas, celobiohidrolasas y β -glucosidasas. Fuente: Kumar et al., 2008

La hemicelulosa es la segunda biomasa renovable más abundante y representa el 25-35% de la biomasa lignocelulósica. Las hemicelulosas son polímeros heterogéneos edificados por pentosas (D- xilosa, D- arabinosa), hexosas (D - manosa D- glucosa, D- galactosa) y ácidos de azúcar. Hay varias enzimas responsables de la degradación de la hemicelulosa como se aprecia en la figura 1.3 (Kumar et al., 2008).

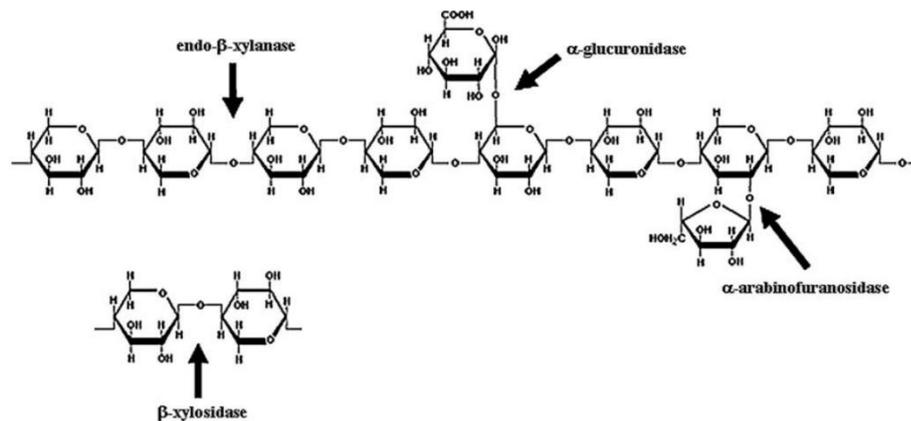


Figura 1.3 Estructura química de hemicelulosa y objetivos de las enzimas hidrolíticas que intervienen en la degradación del polímero hemicelulósico. Fuente: Kumar et al., 2008

La lignina, se caracteriza por proporcionar rigidez a la pared celular, siendo el polímero natural más complejo respecto a su estructura y heterogeneidad. Su estructura consta de unidades de fenilpropano, siendo fundamentalmente amorfo. La lignina se conforma de tres grandes estructuras se conjugan para formar dicha estructura: 4 - hidroxifenil (1) , guayacil (2) , y siringil (3) estructuras que se muestran en la figura 1.4) (Hatakeyama y Hatakeyama, 2010).

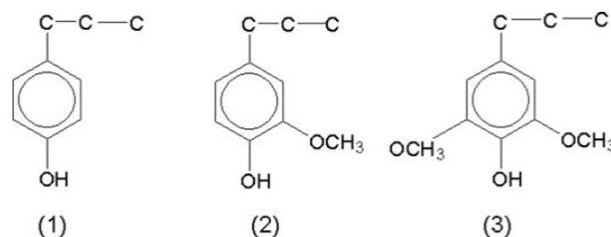


Figura 1.4 Estructuras que forman parte de la lignina. Fuente Hatakeyama y Hatakeyama, 2010

El complejo enzimático de *Trichoderma reesei* (CTR) contiene celulasas y su mecanismo de acción de ilustra en la figura 1.5 (Sigma-Aldrich, 2015), mientras que el complejo enzimático comercialmente conocido como Driselasa, producido por *Basidiomicetos* sp., además de tener actividad celulolítica tiene actividad laminarinasa (hidroliza enlaces glicosídicos β 1-3) y xilanasas (hidroliza enlaces β 1-4-D-xilopiranosas) cuyos mecanismos de acción se indica en las figuras 1.6 ; 1.7 y 1.8 (Sigma-Aldrich, 2015).

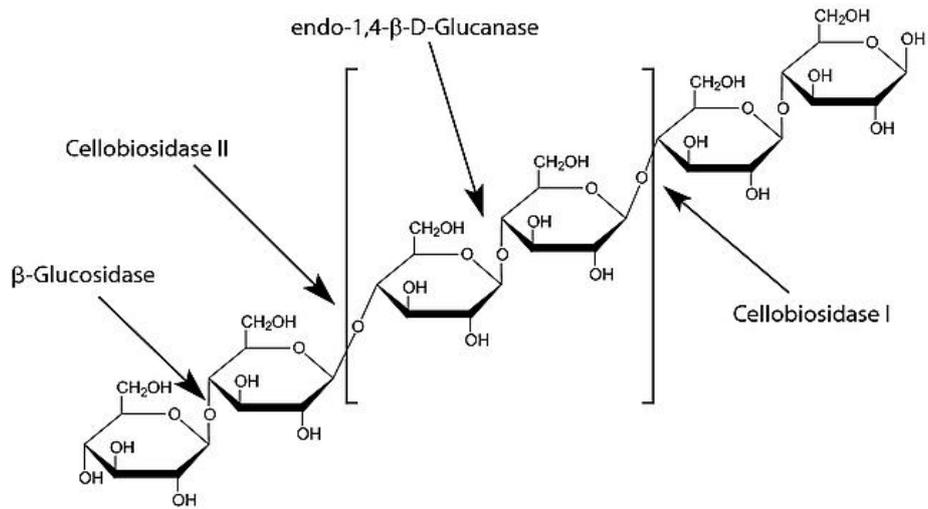


Figura 1.5 Complejo enzimático de *Trichoderma reesei* y su mecanismo de acción. Fuente: Sigma-Aldrich

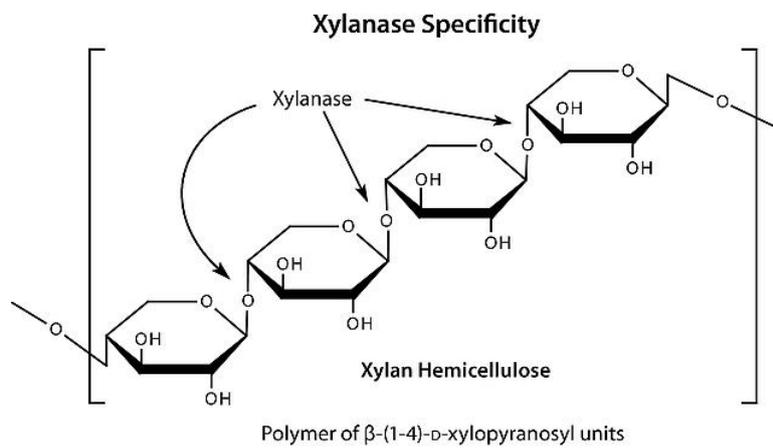


Figura 1.6 Mecanismo de acción de Driselasa a través de la enzima xilanasa. Fuente: Sigma-Aldrich

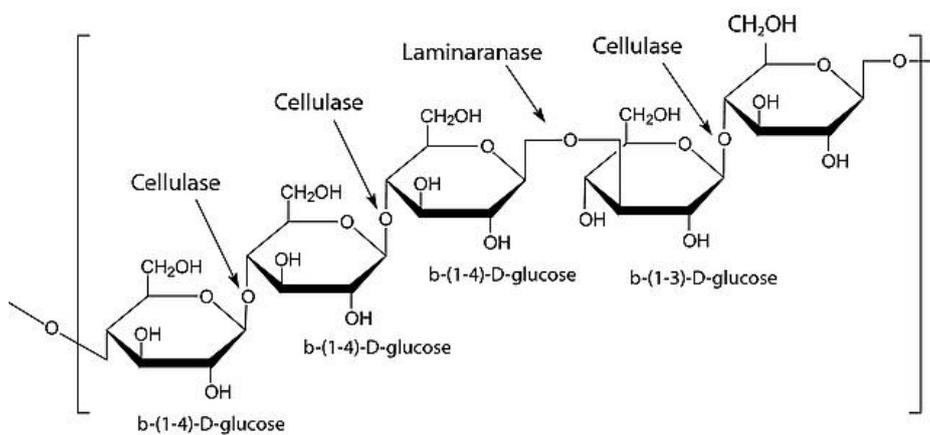


Figura 1.7 Mecanismo de acción de Driselasa a través de la enzima laminaranasa. Fuente: Sigma-Aldrich

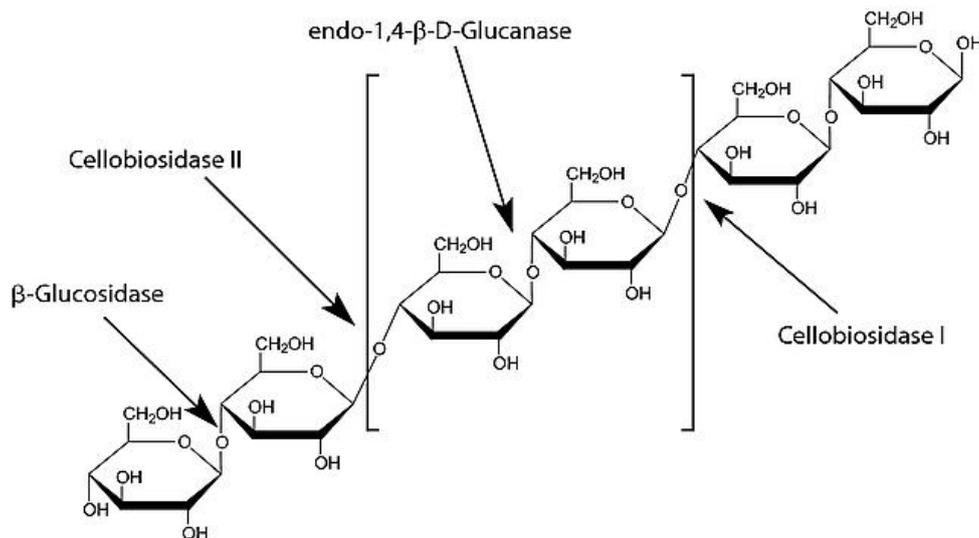


Figura 1.8 Mecanismo de acción de Driselasa por enzimas endoglucanasas, celobiohidrolasas y β-glucosidasas. Fuente: Sigma-Aldrich

1.5.2 Ácido giberélico

Las giberelinas (GA) actúan como reguladores endógenos que promueven el crecimiento y elongación celular, debido a un aumento en el número de células y en la longitud de las células en respuesta a las aplicaciones exógenas. La velocidad de elongación puede estar influida tanto por la extensibilidad celular de la pared como por la velocidad de incorporación de agua dirigida osmóticamente.

Las giberelinas no tienen ningún efecto sobre los parámetros osmóticos, pero existen numerosas evidencias de que provocan un aumento tanto de la extensibilidad como de la tensión de relajación de las paredes de las células vivas. Aunque las giberelinas activas están libres, se conoce una gran variedad de glucósidos formados por la unión covalente de una giberelina y un azúcar. Estos conjugados de giberelinas predominan sobre todo en algunas semillas. El azúcar con el que se conjuga normalmente es la glucosa y puede unirse a una glucosa a través del grupo carboxilo, dando lugar a una giberelina glucósido, o a un grupo hidroxilo, dando lugar a una giberelina glucosil-éter (Taiz y Zeiger, 2002).

Existen evidencias de que la enzima xioglucano endotransglucosilasa (XET) está implicada en el crecimiento de la pared inducida por giberelinas. La función de XET podría facilitar la penetración de las expansinas en la pared celular. Las expansinas son proteínas celulares que provocan la pérdida de la pared en condiciones ácidas al debilitar los puentes de hidrógeno entre los polisacáridos. Tanto las expansinas como

XET pueden ser necesarias para la elongación celular estimulada por giberelinas. Una característica importante de las paredes celulares en crecimiento es que se extienden mucho más rápidamente a pH ácido que a pH neutro (Taiz y Zeiger, 2002).

En un estudio que se realizó para evaluar el papel del AG en semillas del género *Capparis*, se sumergieron inicialmente en agua tibia (40°C) durante la noche y se trató con ácido sulfúrico durante 20 minutos, luego estas semillas ingresaron en la cámara de germinación durante 28 días mantenidas con aplicaciones de AG, obteniéndose una tasa de germinación del 61% con semillas tratadas durante 24 horas con AG (Soyler y Khawar, 2007).

2. OBJETIVOS

Dada la importancia que la escarificación de las semillas con cubiertas duras tiene en su germinación, y que el efecto de la escarificación enzimática es la menos ensayada en general, y en particular en las semillas de alcaparra, como objetivo principal de este trabajo se plantea estudiar la influencia de la escarificación enzimática. Para conocer si la aplicación de AG potencia el efecto de la escarificación en la germinación de las semillas, los ensayos de germinación se realizan con, y sin, la aplicación de AG al sustrato de germinación. Por otra parte, considerando que no se ha encontrado información descriptiva sobre estas semillas, se realizará un estudio histológico para cumplir con este fin.

3. MATERIAL Y MÉTODOS

3.1 EFECTO DE LOS COMPLEJOS ENZIMÁTICOS EN LA GERMINACIÓN DE LA SEMILLA DE *Capparis spinosa*

Para analizar la influencia de los complejos enzimáticos en la escarificación de las semillas se realizaron dos experimentos. En el primero se ensayó el complejo CTR, del que no se tenía constancia de que se hubiera utilizado anteriormente en la escarificación de semillas, y se comparó su efecto con respecto a otro complejo enzimático que ya se había ensayado en semillas de alcaparra (Pascual et al., 2004), ensayando dos tiempos de aplicación de los complejos. La metodología utilizada en cuanto a concentración, temperatura, pH, etc, fue la utilizada por Park et al. (2010) al estudiar el efecto de varias

enzimas comerciales, con características semejantes en su actividad catalítica al CTR, logrando hidrolizar la celulosa de un sustrato como el papel y evaluando entre otros factores, el porcentaje de escarificación. Una vez conocido el resultado positivo obtenido con el CTR en relación a la Driselasa, se realizó un segundo experimento, ensayando cuatro concentraciones en dos tiempos de aplicación.

3.1.1 Efecto de los complejos enzimáticos Driselasa y *Trichoderma reesei*

Las semillas utilizadas fueron obtenidas a partir de frutos recolectados en octubre de 2014 de plantas situadas en una parcela experimental junto al campus de la UPV. Previo al inicio del proceso de escarificación enzimática y con el fin de prevenir enfermedades fúngicas, las semillas fueron tratadas durante 15 minutos en hipoclorito de sodio, luego enjuagadas con agua destilada.

Cada reacción enzimática fue conducida dentro de matraces Erlenmeyer de 250cm³ conteniendo una solución buffer (pH 5.0) de 0.1 M de citrato-fosfato con 7.0 g de semillas en cada matraz. Para los tratamientos con Driselasa (Basidiomycetos, Sigma-Aldrich) se añadieron 0.3 g de la enzima en 60ml de solución, mientras que para los tratamientos con CTR (ATCC 26921, Sigma-Aldrich) se utilizó 7.5ml disueltos en 60 ml de solución, incubados a 35°C durante 60 y 120 horas con agitación permanente a 50 rpm. Con la semilla escarificada, se evaluó la incidencia de la aplicación al sustrato de una solución de AG (500 ml L⁻¹ ; Pascual et al., 2004) durante el proceso de germinación.

Tabla 3.1 Concentración y tiempo de escarificación de los complejos enzimáticos de *Trichoderma reesei* (CTR) y de Driselasa

Complejo enzimático	Concentración (%)	Tiempo de escarificación (horas)
CTR	12.5	60 y 120
Driselasa	0.5	60 y 120

La siembra se realizó dentro de placas Petri de 9 cm en cuyo interior se ubicaron 50 semillas entre dos capas de papel filtro esterilizado (75 g/m²) (ISTA, 1999). El papel se

humedeció con una solución de 500 mg L⁻¹ de AG (1.6% p/v), (pH= 3.13). Para el tratamiento control se utilizó agua destilada. Las placas Petri adecuadamente señaladas fueron trasladadas a una cámara Climatronic, fijando la temperatura en 30°C con 12 horas de luz fluorescente y 20°C sin luz durante 12 horas al día con una humedad relativa del 70%, donde se han mantenido durante 90 días. Durante este período de tiempo, las semillas fueron monitoreadas cada 2 a 3 días con el fin de contabilizar aquellas que han germinado y además mantener la humedad del sustrato con agua y la solución de AG. Se consideró como semillas germinadas a aquellas que rompieron la cubierta y permitieron la salida de la radícula.

Todos los experimentos se realizaron de la misma manera, se utilizaron en cada caso 4 repeticiones de 50 semillas. Los ensayos de germinación se consideraron aceptables cuando la diferencia entre los porcentajes máximos y mínimos entre las 4 repeticiones no sobrepasaban la tolerancia establecida por las Reglas Internacionales para ensayos de semilla (ISTA, 1999). En el ensayo se utilizó un diseño factorial 3 X 2 con cuatro repeticiones por tratamiento, considerando como primer factor a los complejos enzimáticos de CTR, Driselasa y Control, que para efectos del análisis estadístico se denominarán “Escarificación”. Como segundo factor se considera el tiempo de escarificación, 60 y 120 horas, identificado como “Tiempo”. Como tercer factor se considera la aplicación de la solución de 500 ml L⁻¹ de AG al sustrato, que para efectos del análisis estadístico se denominarán “Hormonal”. Los datos de germinación de cada repetición se ajustaron a la función logística (Pascual et al., 2003) que se presenta a continuación:

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

Donde:

G= germinación acumulada (%)

t= tiempo de germinación (días)

A= porcentaje final de germinación

β y k son parámetros de la función

Se calcularon A, β y k, a partir de los cuales se determinaron los parámetros con importancia biológica: (tiempo en días para alcanzar el 50% del porcentaje final de germinación ($t_{50} = \beta/k$) y tasa media de germinación acumulada ($k/2$, día⁻¹). Las variables (G, A, $k/2$ y t_{50}) fueron analizadas a través de un Análisis de Varianza mediante el programa informático Statgraphics Centurion XVI (Statistical Graphics Corporation, 2011). Una probabilidad de $\leq 5\%$ fue considerada significativa. Los valores de las medias fueron evaluados usando el Test LSD en $P \leq 0.05$. Previo al análisis de la varianza los valores porcentuales de G y A se transformaron mediante la función $\arcsen\sqrt{\cdot}$.

3.1.2 Efecto de distintas concentraciones del complejo de *Trichoderma reesei*

Para evaluar el efecto de distintas concentraciones del CTR se consideraron cuatro concentraciones (Tabla 3.2) incubadas a 35°C, con un pH de 5 durante 30 y 60 horas.

Con las semillas escarificadas se realizó la siembra y aplicación de AG y agua al sustrato, como fue descrito en el apartado 3.1.1.

La evaluación del efecto de las cuatro concentraciones del complejo enzimático, se apoyó con mediciones de color. Para lo cual se extrajo 50 mL de cada concentración, en los tiempos señalados, cuyo volumen se trasvasó a una placa Petri, con un colorímetro se efectuaron tres disparos sobre la superficie líquida de cada extracto. De esta manera se obtenían tres parámetros conocidos como coordenadas Hunter (L, a, b) y que poseen el siguiente significado:

- L: indica la luminosidad del color, variando desde el 0 que indicaría el color negro a 100 que indicaría el blanco.
- a: varía de -60 a +60, indicando los colores verdes cuando su valor es negativo y los rojos cuando son positivos.
- b: también varía de -60 a +60, siendo azules los valores negativos y amarillos los positivos.

Una vez obtenidas estas coordenadas se obtuvo la media de cada muestra calculándose posteriormente el valor Croma expresado como $(a^2 + b^2)^{1/2}$ que nos permite cuantificar la evolución de las tonalidades desde amarillentas a rojizas que van adoptando las soluciones con los complejos enzimáticos en función del tiempo.

Las semillas escarificadas obtenidas de cada concentración del complejo enzimático CTR, se analizaron los contenidos de celulosa, hemicelulosa y lignina por el método de Van Soest et al., (1991). Se completó el análisis de esta apartado con la lectura de los sólidos solubles totales para cada concentración, al tiempo señalado anteriormente. La medición se realizó con un refractómetro digital. Además, de manera paralela al ensayo de germinación con la semilla escarificada se analizan los contenidos en materia seca de celulosa, hemicelulosa y lignina con el protocolo señalado por Van Soest et al., (1991).

Tabla 3.2 Concentración y tiempo de escarificación del complejo enzimático *Trichoderma reesei* (CTR) utilizado en el segundo experimento

Concentración (%)	Tiempo de escarificación (horas)
6.25	30
12.50	30
18.75	30
25.00	30
6.25	60
12.50	60
18.75	60
25.00	60

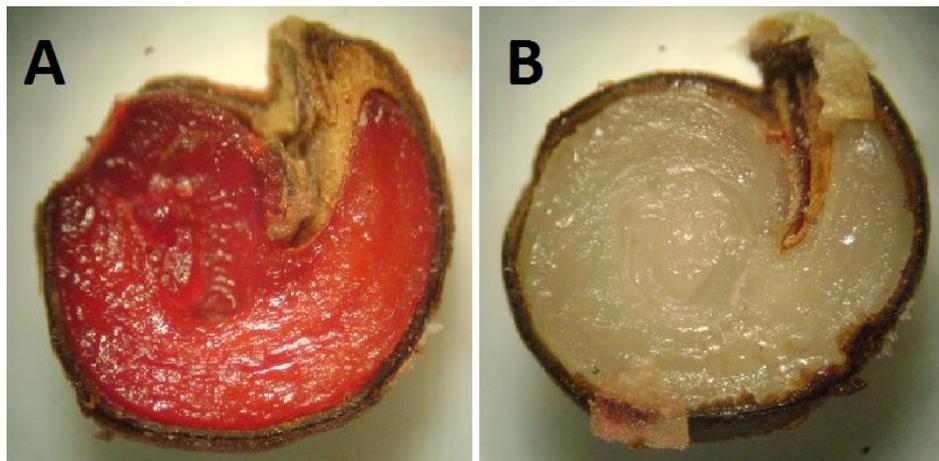
Para la evaluación estadística de las cuatro concentraciones del CTR, se utilizó un diseño factorial 5 X 2 con cuatro repeticiones por tratamiento, teniendo en el primer factor a las cuatro concentraciones del complejo enzimático más el control, que para efectos del análisis estadístico se denominarán “Concentraciones”. El segundo factor está formado por el tiempo de escarificación de 30 y 60 horas, denominado “Tiempo”. El tercer factor constituye la aplicación de AG (y agua como control) al sustrato cuyo factor se denominará “Hormonal”

Los datos de germinación de cada repetición se ajustaron a la función logística y se analizaron de manera idéntica a los descrito en el apartado 3.1.1 .

3.1.3 Prueba topográfica al tetrazolio para semillas de alcaparra

Al finalizar cada experimento, se realizó un test de viabilidad de las semillas no germinadas de cada repetición al finalizar el ensayo de germinación, y también de las

semillas tal y como están almacenadas, sin realizarles ningún tratamiento. Para realizar este test de viabilidad se siguió el Manual de ensayos al tetrazolio del Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación (1986). Se usó el producto comercial tetrazolium (Tetrazolium Red. 2,3,5-Triphenyltetrazolium chloride; Sigma) al 1%. En 100 mL de agua destilada se diluyó 1 g del producto comercial. Para realizar el experimento, se usó un tubo de ensayo para las semillas que no habían germinado de cada repetición. Para las semillas no tratadas se realizaron 4 repeticiones de 20 semillas. Se realizó un pequeño corte en la cubierta de la semilla, en la parte opuesta al micrópilo, para que penetrara adecuadamente el producto. Las semillas se sumergieron en la dilución del tetrazolio y se dejó en oscuridad durante 24 horas. Se consideró semillas viables las que tenían el embrión completamente teñido (fotografía 3.1.A), según el criterio fijado en el Manual de ensayos al tetrazolio del Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación (1986) para las semillas del género *Capparis*. Se consideraron semillas totalmente inviables las que presentaban el embrión totalmente blanco (fotografía 3.1.B).



Fotografía 3.1 Semillas teñidas con tetrazolio: (A) Semillas viables y (B) semillas inviables, observadas a 13 aumentos con lupa marca Euromex

3.2 DESCRIPCIÓN HISTOLÓGICA DE LA SEMILLA DE *Capparis spinosa*

Para la descripción de la semilla de alcaparra, se realizaron diferentes cortes histológicos en cada uno de los tratamientos de escarificación así como en la semilla control para luego ser visualizado en las imágenes obtenidas a través de la lupa y del microscopio electrónico de barrido. Las citadas imágenes fueron obtenidas en el Servicio de Microscopía Electrónica de la UPV siguiendo los protocolos que esta

dependencia dispone para el tratamiento de muestras vegetales; además se apoyó el trabajo fotográfico con una lupa del Laboratorio de Fitotecnia General como se detallan en la tabla 3.3.

Tabla 3.3 Equipos utilizados en los experimentos con semilla de *Capparis spinosa*

Equipo	Marca	Modelo
Lupa	Leica	MZ APO
Lupa (Fitotecnia General)	Euromex	PB4161
Microscopio electrónico de barrido	JEOL	JSM6300
Colorímetro	Minolta	CR300
Refractómetro	Atago	PAL-1
Cámara de germinación	Climatronic	Inst. Tratavent

4. RESULTADOS y DISCUSIÓN

4.1 EFECTO DE LOS COMPLEJOS ENZIMÁTICOS EN LA GERMINACIÓN DE LA SEMILLA DE *Capparis spinosa*

4.1.1 Efecto de los complejos enzimáticos Driselasa y *Trichoderma reesei*

Al evaluar el efecto de los complejos enzimáticos Driselasa y CTR, los coeficientes de determinación (R^2) para las 48 curvas fueron superiores a 0.97 resultando estadísticamente significativo ($P \leq 0.01$).

Estos resultados, confirman que el uso de la función logística es adecuado para evaluar la germinación de semillas de alcaparra, de igual manera que lo fue en estudios anteriormente realizados en *Capparis* (Pascual *et al.*, 2003; Pascual *et al.*, 2004; Pascual *et al* 2006).

En las figuras 4.1, 4.2 y 4.3 se muestran las curvas ajustadas correspondientes a los valores medios de los tres factores analizados en el primer experimento. Los dos complejos (figura 4.1), la mayor duración del experimento (figura 4.2) y la aplicación de AG (figura 4.3) han incrementado y adelantado la germinación con respecto al control.

En la figura 4.4 se presentan únicamente los valores correspondientes a la interacción Escarificación X Tiempo, que es la que se considera más interesante, con vistas a simplificar en lo posible la presentación de los resultados, y dado que el efecto de la aplicación de AG ha resultado idéntico al obtenido en estudios anteriores realizados en las semillas de esta especie, tal y como se comenta posteriormente.

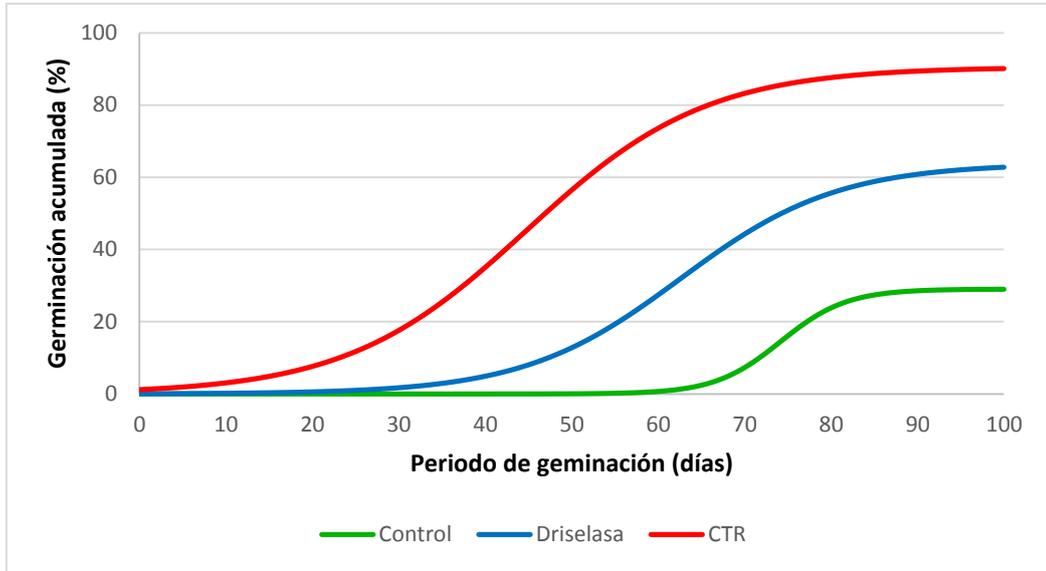


Figura 4.1 Modelo logístico ajustado a la germinación acumulada correspondiente a los valores medios de los complejos enzimáticos. Primer experimento.

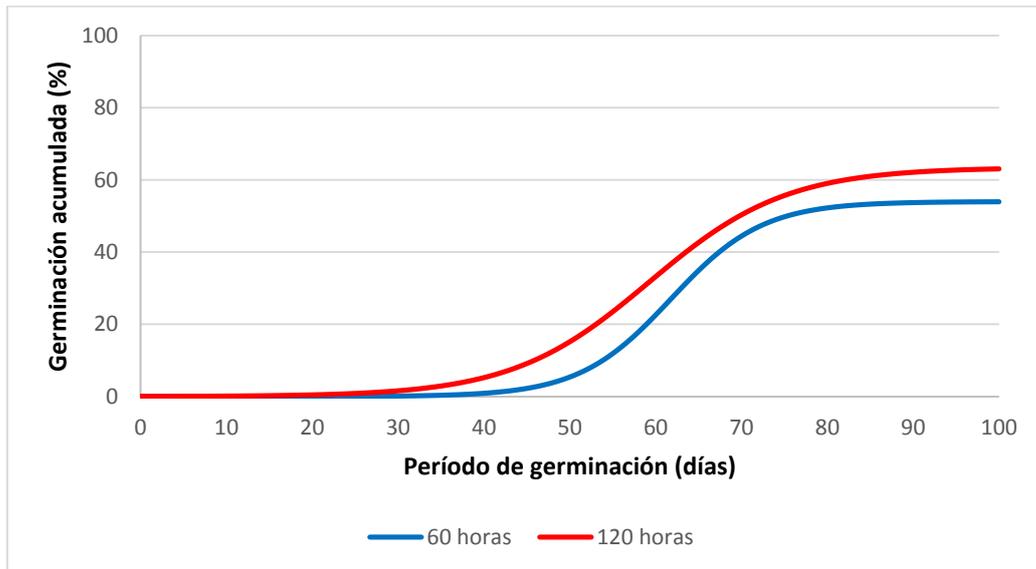


Figura 4.2 Modelo logístico ajustado a la germinación acumulada correspondiente a los valores medios de los tiempos de aplicación de los complejos enzimáticos. Primer experimento.

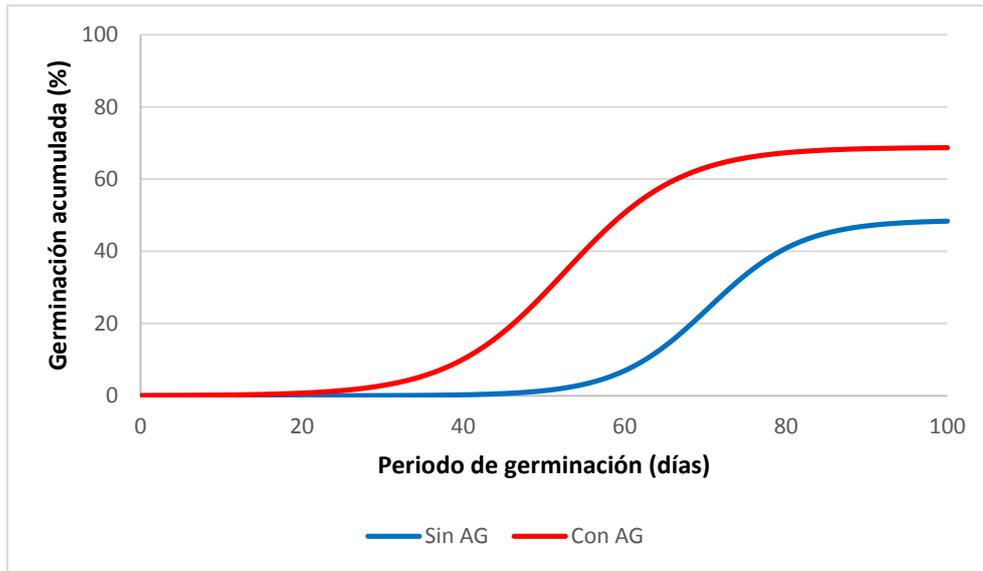


Figura 4.3 Modelo logístico ajustado a la germinación acumulada correspondiente a los valores medios de los tiempos de aplicación de ácido giberélico (AG). Primer experimento.

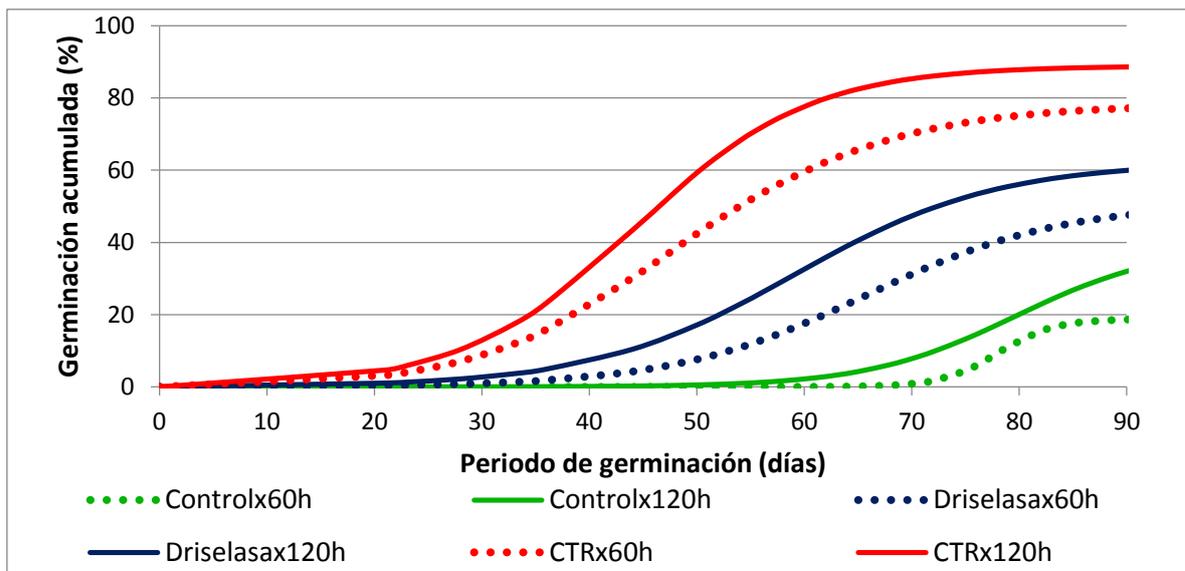


Figura 4.4 Modelo logístico para el primer experimento ajustado a la germinación acumulada correspondiente a los valores medios de la interacción de los complejos enzimáticos y el tiempo de escarificación.

Observando en la figura 4.4 el comportamiento de la combinación de tratamientos se aprecia que el escarificador ha tenido un mayor efecto cuanto mayor ha sido el tiempo de contacto entre la semilla y el complejo enzimático. Este fenómeno podría interpretarse como la capacidad del CTR para hidrolizar la celulosa facilitando el ingreso de agua a través de la testa y el tegmen hacia el embrión.

Todos los parámetros evaluados han sido afectados significativamente ($p \leq 0.01$) por el complejo enzimático utilizado, por el tiempo de aplicación, por la aplicación de AG, así como por sus interacciones ($p \leq 0.05$ en el caso de la interacción Tiempo x AG). El factor que más influencia ha tenido sobre la germinación acumulada (G) y sobre el máximo porcentaje de germinación (A) es el complejo enzimático, representando el 75% de la variabilidad de G, seguido de la aplicación de AG (9.1%) y del tiempo de escarificación (8.4%). El efecto del AG está de acuerdo con los resultados obtenidos en estudios anteriores (Pascual *et al.*, 2003; Pascual *et al.*, 2004; Pascual *et al.* 2006).

Tabla 4.1 Influencia de la escarificación enzimática (complejo enzimático), del tiempo de la escarificación (horas) y de la aplicación de AG, 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 ($k/2$, días^{-1}), del primer experimento.

		G	A	t50	k/2
Escarificación (E)	Control	28.50 c	29.04 c	74.17 a	0.13 a
	Driselasa	63.81 b	56.53 b	62.57 b	0.06 b
	CTR	94.63 a	90.56 a	44.77 c	0.05 c
Tiempo (T)	60 h	53.29 b	53.98 b	61.76 a	0.09 a
	120 h	71.33 a	63.44 a	59.24 b	0.06 b
Hormonal (AG)	Sin AG	52.92 b	48.64 b	69.39 a	0.09 a
	Con AG	71.71 a	68.78 a	51.61 b	0.07 b

Análisis de varianza Parámetros (g.l.)	% Suma de Cuadrados							
Escarificación(2)	74.91%	**	77.85%	**	51.82%	**	46.53%	**
Tiempo (1)	8.35%	**	2.75%	**	0.56%	**	7.92%	**
AG (1)	9.06%	**	12.47%	**	28.00%	**	2.31%	**
E x T (2)	2.01%	**	2.94%	**	1.07%	**	33.53%	**
E x AG (2)	4.49%	**	2.64%	**	15.09%	**	8.45%	**
T x AG (1)	0.17%	*	0.75%	**	1.30%	**	0.02%	*
Residual (36)	1.01%		0.60%		2.16%		1.24%	

Letras distintas en una misma columna indican diferencias ($p \leq 0.05$) según el test LSD. ns: No significativa, *nivel de significación $p \leq 0.05$ ** nivel de significación $p \leq 0.01$.

La interacción Escarificación X Tiempo ha resultado significativa ($p \leq 0.01$), constatándose un mayor incremento en la germinación al aumentar el tiempo, con la Driselasa respecto al CTR y al control. No obstante, se observa que al pasar de 60 a 120

h en el control se aumenta ($p \leq 0.05$) el valor de G, por lo que podría pensarse en que la mejora en la germinación (al aumentar el tiempo) se debe fundamentalmente (si no, únicamente) al efecto del remojo (incluida la agitación). Por este motivo en el segundo experimento se analizó el color y el contenido en sólidos solubles totales en la solución del complejo enzimático al finalizar el tratamiento de la escarificación, con el objetivo de poder detectar la previsible degradación de la celulosa y de la hemicelulosa.

Tabla 4.2 Análisis de las interacciones significativas de los análisis de la varianza de la tabla 4.1. E: Escarificación enzimática (complejo enzimático). T: Tiempo de la escarificación (horas). AG: Aplicación de AG. G(%): Germinación acumulada. A (%): Máximo porcentaje de germinación. t50 (β/k , días): Número de días necesarios para alcanzar el 50% de la germinación final. k/2 (días⁻¹): Velocidad media relativa de germinación acumulada. Primer experimento.

		G	A	t50	k/2
E X T	Control x 60 h	19.00	18.84	74.95	0.190
	Control x 120h	38.00	39.24	73.39	0.071
	Driselasa x 60 h	49.63	50.87	66.15	0.056
	Driselasa x 120h	78.00	62.19	58.99	0.054
	CTR x 60 h	91.25	92.24	44.18	0.034
	CTR x 120 h	98.00	88.89	45.36	0.063
	LSD ($p \leq 0,05$)	3.57	2.51	2.81	0.007
E X AG	Control x Sin AG	10.00	12.94	91.75	0.161
	Control x Con AG	47.00	45.14	56.59	0.100
	Driselasa x Sin AG	57.13	47.25	69.78	0.055
	Driselasa x Con AG	70.50	65.81	55.36	0.055
	CTR x Sin AG	91.63	85.72	46.64	0.043
	CTR x Con AG	97.63	95.41	42.90	0.054
	LSD ($p \leq 0,05$)	3.57	2.51	2.81	0.007
T x AG	60 h x Sin AG	45.17	46.38	68.73	0.104
	120 h x Sin AG	60.67	50.89	70.05	0.068
	60 h x Con AG	61.42	61.58	54.79	0.083
	120 h x Con AG	82.00	75.98	48.44	0.057
	LSD ($p \leq 0,05$)	2.91	2.05	2.29	0.01

Puede afirmarse que la temperatura y el pH de la solución fueron adecuados en relación al peso de las semillas utilizadas para conseguir la actividad enzimática del complejo de *Trichoderma reesei*; de igual manera, el volumen de la solución fue acorde con el peso de las semillas. En cuanto al máximo porcentaje de germinación (A), como

era de esperar, se observa una clara influencia de los factores evaluados de manera semejante al comportamiento que presentó el porcentaje de germinación acumulada (G). En los dos parámetros citados, el mayor porcentaje de germinación ($p \leq 0.05$) se logra con el uso del complejo de CTR.

Los factores analizados y su interacción han resultado significativos ($p \leq 0.05$) sobre t50; la escarificación explica el 50% de la variabilidad total. El uso del CTR durante 120 horas ha reducido en un 38% el t50, adelantando la germinación, mientras que en el complejo Driselasa lo ha disminuido en 19% respecto del control. En la tabla 4.1 se puede apreciar que los mejores valores de t50 corresponden a los ensayos realizados con CTR y aplicación de AG al sustrato.

Al igual que en G y A, el factor que más influencia ha tenido sobre el número de días necesarios para alcanzar el 50% de la germinación final (t50) y sobre la velocidad media relativa de germinación acumulada (k/2) es el complejo enzimático, representando el 52% y el 47% de su respectiva variabilidad. El segundo factor en importancia respecto a la variabilidad obtenida, es la aplicación de AG, que ha supuesto el 28% de la variabilidad obtenida en t50, y la interacción Escarificación X Tiempo, que ha supuesto el 34% de la variabilidad obtenida en k/2. De nuevo, el efecto obtenido en la aplicación del AG sobre estas dos variables, está de acuerdo con los resultados obtenidos en estudios anteriores (Pascual et al., 2003; Pascual et al., 2004; Pascual et al 2006).

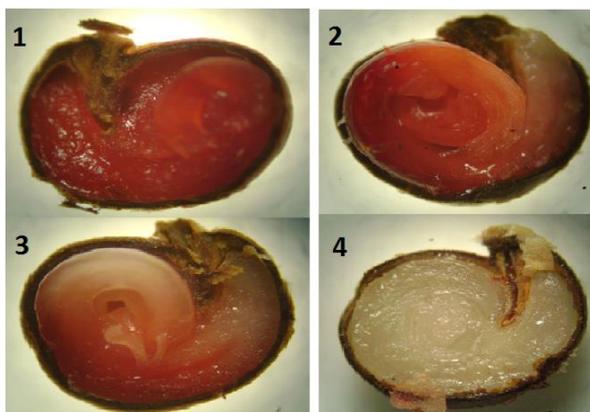
Los resultados obtenidos con Driselasa son similares a los obtenidos con este mismo complejo en un estudio realizado anteriormente en semillas de *Capparis spinosa* (Pascual et al., 2004), y por tanto los obtenidos con CTR superan a los obtenidos en cualquier tratamiento de escarificación de las semillas de alcaparra, tanto en los estudios realizados en España (Pascual et al. 2004, 2006, 2009) como en el extranjero: 38% Macchia and Casano (1993); 48% Yildirim (1998); >50% Rinaldelli (2000); 53% Tansi (1999); 68% Sozzi y Chiesa (1995); 80% Orphanos (1983).

4.1.2 Prueba topográfica al tetrazolio para semillas de alcaparra en el primer experimento

En primer lugar es necesario indicar la dificultad de interpretar la viabilidad de las semillas en las especies que no existe un mapa topográfico del ensayo del tetrazolio,

siendo particularmente difícil diferenciar entre los “tejidos débiles y viables” y los “tejidos teñidos débiles, no-viables”, por lo que se diferenció entre “semillas viables”, “semillas viables con bajo vigor” y “semillas no viables” (fotografía 4.1)

La viabilidad de las semillas control (tal y como están almacenadas, sin ningún tratamiento) es del 97.5 % (“semillas viables”). La viabilidad de las semillas no germinadas tras la realización del ensayo de germinación, ha resultado muy elevada (tabla 4.3), en promedio 91% y del 100% en el caso de la combinación del complejo de *Trichoderma reesei* y AG, que en este caso, sumado a las semillas germinadas supone una viabilidad próxima al 100%, y por tanto mayor que la viabilidad de las semillas “control”, lo que indica que el complejo enzimático (ninguno de los dos) ha afectado negativamente a la viabilidad de las semillas, e incluso cabría pensar que la combinación de los dos tratamientos (complejo enzimático) y AG pueden aumentar la actividad biológica e incrementar el vigor, y por tanto la viabilidad de las semillas, aunque esta hipótesis habría de estudiarse en trabajos posteriores. Lo que está fuera de toda duda es que la aplicación de AG (pH=3.13) en el sustrato durante los 90 días que duró el ensayo, no afectó negativamente a la semilla, como parecía intuirse en estudios realizados paralelamente (Fernández, comunicación personal; 2015).



Fotografía 4.1 Semillas teñidas con tetrazolio: (1) Semillas viables, (2) y (3) semillas viables con bajo vigor y (4) semillas inviables, observadas a 13 aumentos con lupa marca Euromex

Tabla 4.3 Resultados de la prueba topográfica al tetrazolio de las semillas no germinadas tras la realización del ensayo de germinación en el primer experimento

Escarificación	Tiempo (horas)	Hormonal	Viables (%)	Viables, Bajo vigor (%)	No viables (%)
Control	60	Agua	96.00	4.00	0.00
		AG	94.00	6.00	0.00
	120	Agua	90.00	10.00	0.00
		AG	98.00	2.00	0.00
Driselasa	60	Agua	84.00	14.00	2.00
		AG	87.00	12.00	2.00
	120	Agua	85.00	12.00	2.00
		AG	87.00	13.00	0.00
CTR	60	Agua	85.00	15.00	0.00
		AG	100.00	0.00	0.00
	120	Agua	85.00	15.00	0.00
		AG	100.00	0.00	0.00
			Promedio	91.00	9.00

4.1.3 Efecto de distintas concentraciones del complejo de *Trichoderma reesei*

Al evaluar el efecto de distintas concentraciones del CTR, los coeficientes de determinación (R^2) para las 80 curvas fueron superiores a 0.98, resultando el ajuste estadísticamente significativo ($P \leq 0.05$) y por tanto el uso de la función logística es adecuado para evaluar la germinación de las semillas de alcaparra en este ensayo.

En las figuras 4.5, 4.6 y 4.7 se muestran las curvas ajustadas correspondientes a los valores medios de los tres factores analizados para las distintas concentraciones del CTR. La concentración del complejo enzimático (figura 4.5), la duración de la escarificación (figura 4.6) y la aplicación de AG (figura 4.7) han incrementado y adelantado la germinación con respecto al control, disminuyendo el valor de t_{50} y aumentando el valor de $k/2$ al aumentar la concentración y la duración de la escarificación. Al igual que en el primer experimento, en la figura 4.8 se presentan los valores correspondientes a la interacción Concentración X Tiempo.

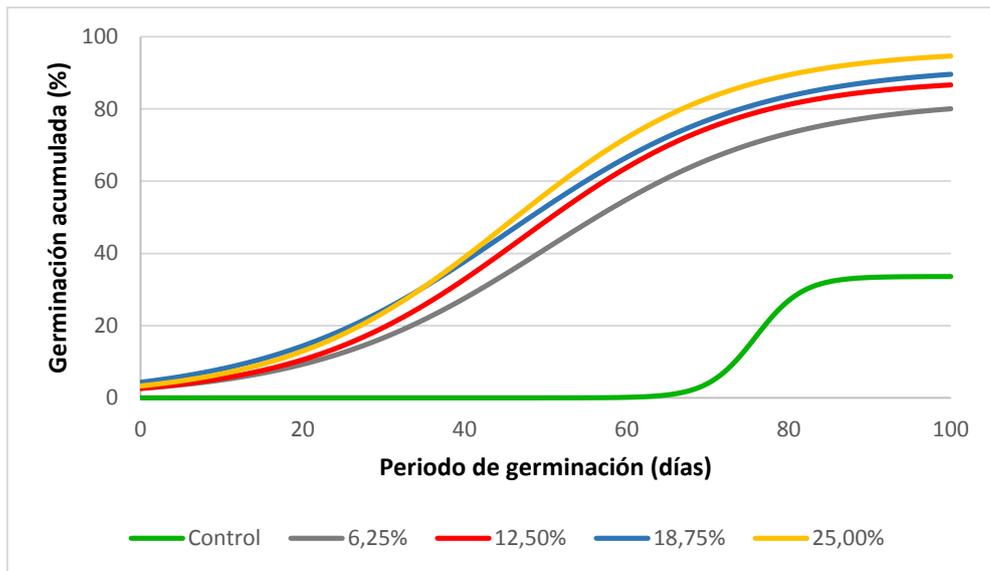


Figura 4.5 Modelo logístico ajustado a la germinación acumulada correspondiente a los valores medios de las concentraciones para el complejo enzimático *Trichoderma reesei*. Segundo experimento.

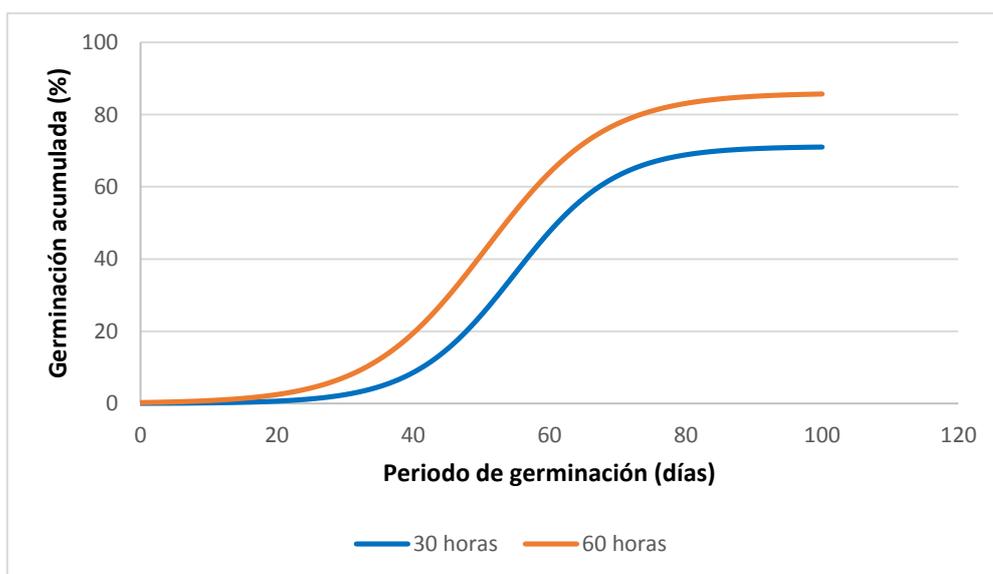


Figura 4.6 Modelo logístico para el segundo experimento ajustado a la germinación acumulada correspondiente a los valores medios de los tiempos de aplicación del complejo enzimático *Trichoderma reesei*. Segundo experimento

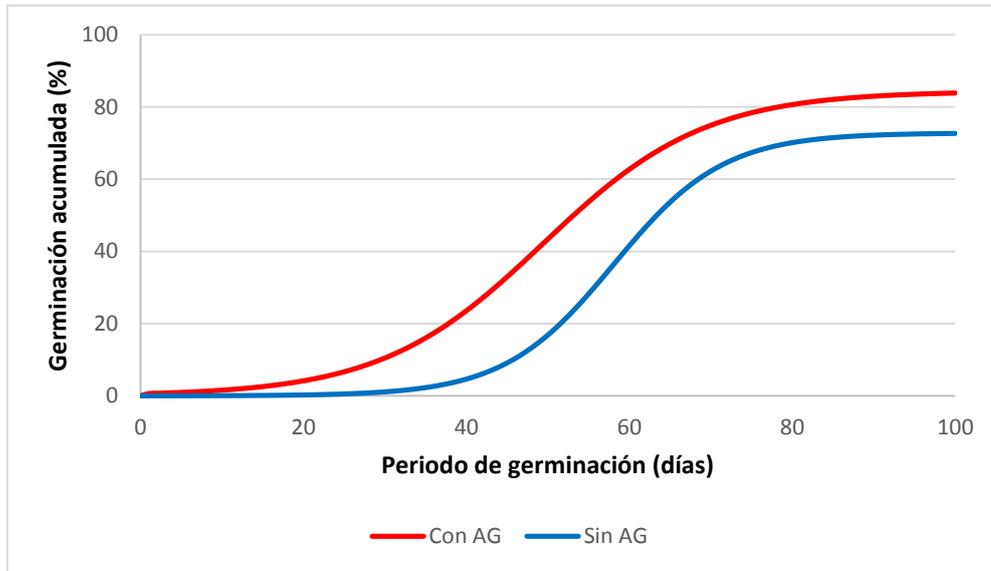


Figura 4.7 Modelo logístico para el segundo experimento ajustado a la germinación acumulada correspondiente a los valores medios obtenidos con la aplicación de ácido giberélico. Segundo experimento.

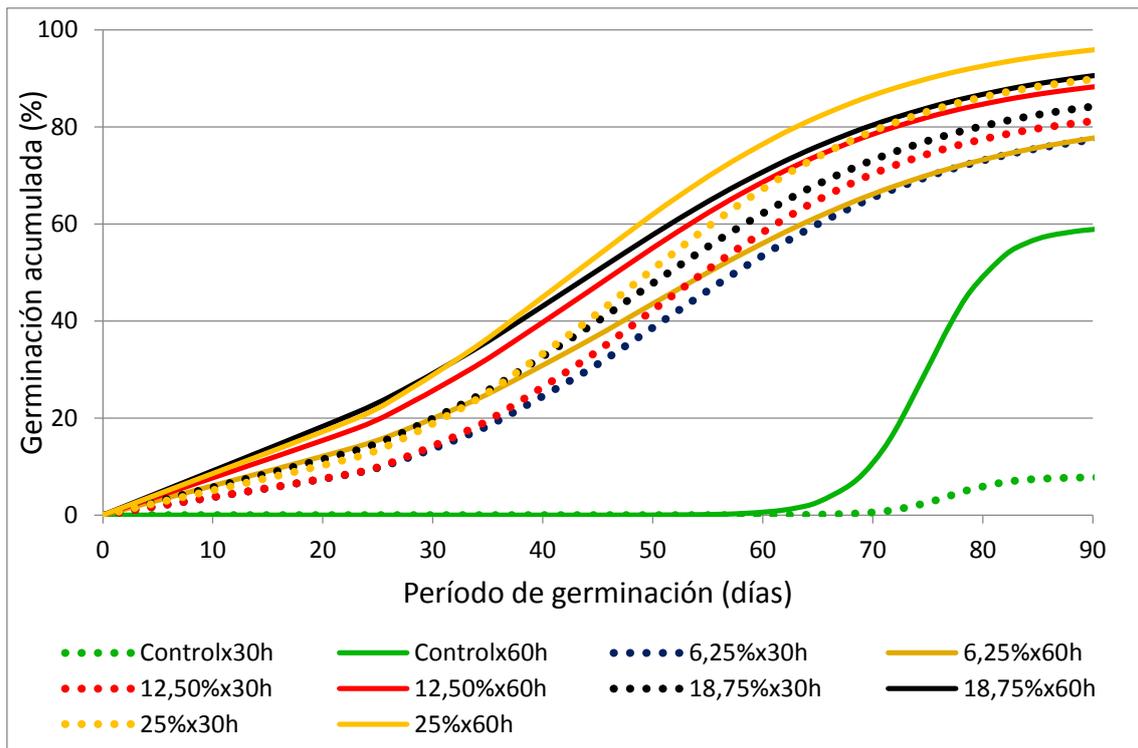


Figura 4.8 Modelo logístico para el segundo experimento ajustado a la germinación acumulada correspondiente a los valores medios de la interacción de las concentraciones y el tiempo de escarificación. Segundo experimento.

Tabla 4.4 Influencia de la escarificación enzimática (diferentes concentraciones del complejo enzimático de *Trichoderma reesei*), del tiempo de la escarificación (horas) y de la aplicación de AG, 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 ($k/2$, días⁻¹), del segundo experimento.

		G		A		t50		k/2	
Concentración (C)	0.00%	34.50	e	33.60	d	75.89	a	0.17	a
	6.25%	79.50	d	82.60	c	50.03	b	0.03	b
	12.50%	87.25	c	88.37	b	47.10	c	0.04	b
	18.75%	91.13	b	91.98	b	45.44	d	0.03	b
	25.00%	95.81	a	96.29	a	45.26	d	0.04	b
Tiempo (T)	30h	70.18	b	71.16	b	54.77	a	0.07	a
	60h	85.10	a	85.98	a	50.72	b	0.06	b
Hormonal (AG)	Con AG	83.68	a	84.35	a	48.42	b	0.05	b
	Sin AG	71.60	b	72.79	b	57.07	a	0.07	a

Análisis de varianza

Parámetros (g.l)	%Suma de Cuadrados							
Concentración(4)	69.01%	**	70.61%	**	77.36%	**	74.62%	**
Tiempo (1)	5.09%	**	4.49%	**	10.59%	**	3.70%	**
AG (1)	7.78%	**	7.38%	**	2.32%	**	0.64%	**
C x T (4)	11.64%	**	11.46%	**	0.28%	**	0.65%	**
C x AG (4)	3.16%	**	2.63%	**	8.07%	**	18.11%	**
T x AG (1)	0.39%	**	0.48%	**	0.36%	**	0.58%	**
Residual (64)	2.92%		2.95%		1.02%		1.69%	

Letras distintas en una misma columna indican diferencias ($p \leq 0.05$) según el test LSD. ns: No significativa, *nivel de significación $p \leq 0.05$ ** nivel de significación $p \leq 0.01$

Todos los parámetros evaluados han sido afectados significativamente ($p \leq 0.01$) por las concentraciones del complejo enzimático de *Trichoderma reesei*, por el tiempo de aplicación, por la aplicación de AG, así como por sus interacciones. El factor que más influencia ha tenido sobre el máximo porcentaje de germinación (A) es la concentración, representando el 69% de la variabilidad de G, seguido de la aplicación de AG (7.8%) y del tiempo (5.1%). Las germinaciones obtenidas en las soluciones menos concentradas (6.25%) son superiores a las obtenidas en el primer experimento con Driselasa, mientras que con las mayores concentraciones se han alcanzado germinaciones similares a las allí presentadas para CTR, por lo que como ya se ha

comentado superan a las germinaciones obtenidas en estudios anteriores (Orphanos, 1983; Macchia y Casano, 1993; Sozzi y Chiesa, 1995; Yildirim, 1998; Tansi 1999; Rinaldelli, 2000; Pascual et al. 2004, 2006 y 2009).

Tabla 4.5 Análisis de las interacciones significativas de los análisis de la varianza de la tabla 4.3. C: Concentración del complejo enzimático de *Trichoderma reesei*. T: Tiempo de la escarificación (horas). AG: Aplicación de AG. G(%): Germinación acumulada. A (%): Máximo porcentaje de germinación. t50 (β/k, días): Número de días necesarios para alcanzar el 50% de la germinación final. k/2 (días-1): Velocidad media relativa de germinación acumulada. Segundo experimento. G(%): Germinación acumulada. A (%): Máximo porcentaje de germinación. t50 (β/k, días): Número de días necesarios para alcanzar el 50% de la germinación final. k/2 (días-1): Velocidad media relativa de germinación acumulada.

		G	A	t50	k/2
C x T	Control x 30h	9.00	7.83	76.91	0.185
	Control x 60h	60.00	59.38	74.87	0.155
	6.25% x 30h	79.25	81.66	51.44	0.038
	6.25% x 60h	79.75	83.54	48.62	0.031
	12.5% x 30h	83.25	84.51	50.01	0.040
	12.5% x 60h	91.25	92.24	44.18	0.034
	18.75% x 30h	87.25	88.59	47.75	0.035
	18.75% x 60h	95.00	95.38	43.14	0.031
	25% x 30h	92.13	93.21	47.74	0.039
	25% x 60h	99.50	99.38	42.78	0.035
	LSD ($p \leq 0.05$)	5.11	5.24	1.50	0.009
C x AG	Control x Con AG	50.00	48.18	64.11	0.105
	Control x Sin AG	19.00	19.03	87.67	0.235
	6.25% x Con AG	83.50	86.66	47.26	0.036
	6.25% x Sin AG	75.50	78.55	52.80	0.033
	12.5% x Con AG	91.25	92.13	44.93	0.039
	12.5% x Sin AG	83.25	84.61	49.26	0.035
	18.75% x Con AG	95.13	95.77	42.06	0.036
	18.75% x Sin AG	87.13	88.20	48.83	0.030
	25% x Con AG	98.50	99.03	43.73	0.035
	25% x Sin AG	93.13	93.56	46.80	0.039
	LSD ($p \leq 0.05$)	5.11	5.24	1.50	0.009
T X AG	30h x Con AG	74.55	75.05	49.65	0.060
	30h x Sin AG	65.80	93.65	59.89	0.075
	60h x Con AG	92.80	67.27	47.18	0.041
	60h x Sin AG	77.40	78.32	54.25	0.074
	LSD ($p \leq 0.05$)	3.23	3.31	0.95	0.006

Al analizar la interacción Concentración del complejo enzimático X Tiempo se observa que, por una parte, el tratamiento con complejo enzimático ha aumentado ($p \leq 0.05$) los valores de A y G, disminuyendo los valores de t50 y k/2, y que al aumentar la concentración del complejo enzimático ha aumentado los valores de G y A, y ha disminuido los valores de t50 y k/2. Se observa que la mayor diferencia ($p \leq 0.05$) entre los valores de G (y de A) correspondientes a los dos tiempos de aplicación se ha obtenido en el tratamiento control, es decir cuando únicamente ha influido el remojo (con agitación), mientras que la diferencia entre los valores correspondientes a la concentración de 6.25% no ha resultado significativa ($p \leq 0.05$). La mayor diferencia entre los valores de t50 corresponde a la concentración de 12.50%, mientras que la mayor diferencia entre los valores de k/2 corresponde al control.

De los análisis planteados para intentar conocer el efecto escarificador que realmente ha producido el complejo enzimático, se deduce que el tratamiento con el complejo enzimático ha disminuido la concentración de las semillas en celulosa, hemicelulosa y lignina (tabla 4.6), y este efecto ha sido mayor cuanto mayor ha sido la concentración y mayor el tiempo, incluso en el tratamiento control, por lo que cabe concluir que el simple remojo también produce la degradación de la celulosa, hemicelulosa y lignina. En la tabla 4.3 se observa que el contenido en celulosa de las semillas, disminuye hasta un 25% al aumentar la concentración, independientemente del tiempo de escarificación, lo que coincide con lo reportado por Park et al., (2010) señalando un 25% de reducción del contenido de celulosa a las 30 y 60 horas, con las mismas condiciones de incubación que fueron utilizadas en este experimento, en sus experimentos realizados sobre la degradación de la celulosa en papel (ya que no se han encontrado referencias sobre semillas).

El contenido en sólidos solubles de la solución del complejo enzimático al finalizar el tratamiento de la escarificación aumentó con la concentración del complejo y con el tiempo (tabla 4.7 y figura 4.9), lo que significa una mayor degradación de la celulosa, hemicelulosa y lignina. En el transcurso de la escarificación, y paralelamente al incremento del contenido en sólidos solubles, se constató un cambio en la coloración de la solución, que tomaba una coloración parda (figura 4.10).

Tabla 4.6 Contenido celulosa, hemicelulosa y lignina luego de la escarificación con *Trichoderma reesei* (CTR) a 30 y 60 horas

Tiempo (horas)	Concentración (%)	Celulosa (%ms)	Hemicelulosa (%ms)	Lignina (%ms)
30	0.00	17.41	9.99	31.47
	6.25	14.22	5.61	26.19
	12.50	13.91	5.39	26.32
	18.75	13.64	5.33	25.78
	25.00	13.10	5.03	24.22
60	0.00	14.33	6.70	26.02
	6.25	12.66	5.71	24.64
	12.50	12.29	6.67	21.65
	18.75	12.02	5.06	23.33
	25.00	10.56	4.18	19.60

Tabla 4.7 Medición del contenido en sólidos solubles totales (SST) y coordenadas Hunter correspondientes a la coloración de la solución del complejo enzimático al finalizar la escarificación.

Concentración (%)	Tiempo (horas)	SST (°Brix)	a	b	L
0.00	0	0.00	-0.22	-0.51	90.51
	30	0.00	-0.13	2.04	48.06
	60	0.00	0.27	1.54	44.88
6.25	0	0.00	-0.02	-0.60	50.59
	30	4.23	-0.39	8.19	42.15
	60	4.70	0.95	6.52	31.54
12.50	0	0.00	-0.09	3.07	44.65
	30	7.53	-0.06	8.07	35.66
	60	8.00	0.98	7.41	27.68
18.75	0	0.00	-0.17	5.66	40.92
	30	9.68	0.16	8.06	35.92
	60	10.30	0.18	9.39	10.30
25.00	0	0.10	-0.11	5.88	40.51
	30	14.50	0.54	11.39	34.03
	60	15.30	1.27	11.39	32.57

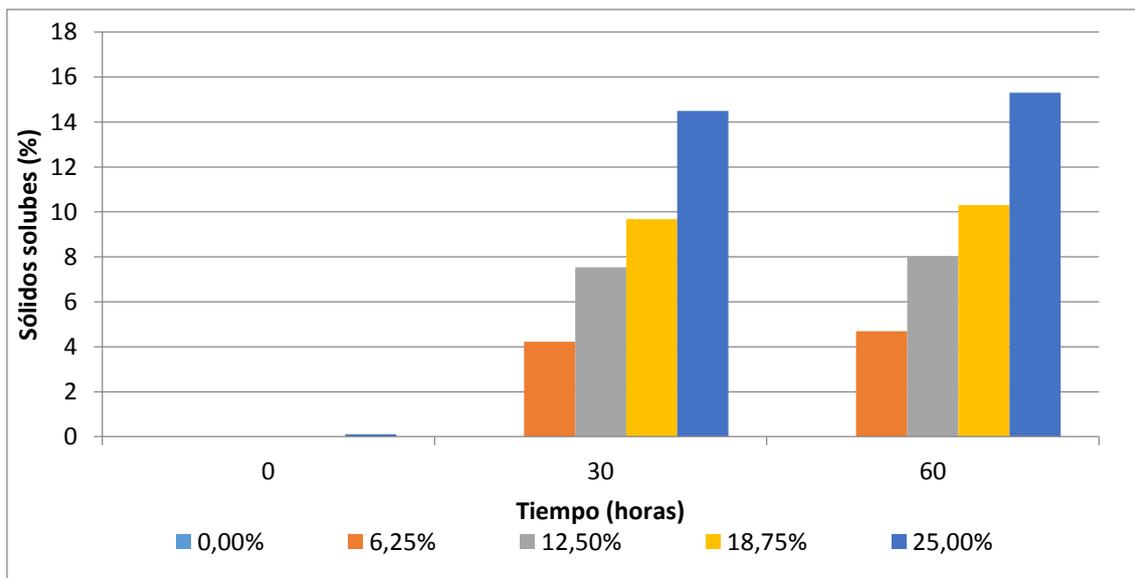


Figura 4.9 Contenido de sólidos solubles totales de la solución del complejo *Trichoderma reesei* al finalizar la escarificación

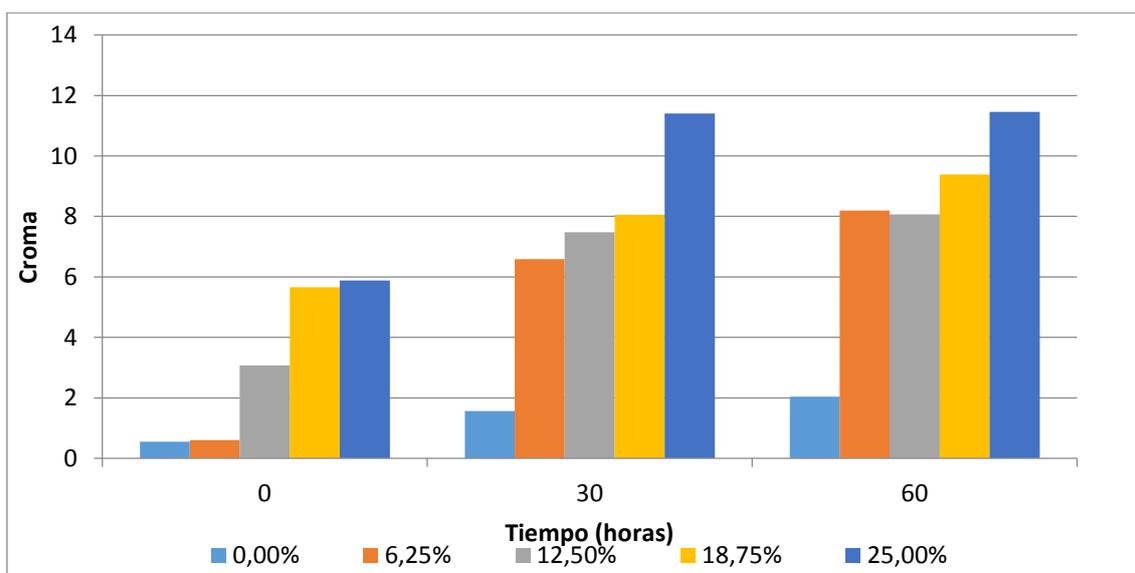


Figura 4.10 Valor de Croma medido en la solución del complejo *Trichoderma reesei* al finalizar la escarificación

4.1.4 Prueba topográfica al tetrazolio para semillas de alcaparra en el segundo experimento

En base a lo descrito en el apartado 4.1.2 del primer experimento. La viabilidad de las semillas no germinadas tras la realización del segundo ensayo de germinación, ha resultado elevada (tabla 4.8), en promedio 92%, y en algunos casos del 100%, por lo

que la viabilidad total de las semillas está próxima al 100%. El valor de la viabilidad de estas semillas coincide con el de las semillas “control” (97.5%), lo que indica que ningún tratamiento ha afectado negativamente a la viabilidad de las semillas, e incluso que, la combinación de determinadas concentraciones (complejo enzimático CTR) y AG podrían haber aumentado la viabilidad de las semillas. Como en el experimento 1, se observa que la aplicación de AG en el sustrato durante los 90 días que duró el ensayo, no afectó negativamente a la viabilidad de las semillas.

Tabla 4.8 Resultados de la prueba topográfica al tetrazolio de las semillas no germinadas tras la realización del ensayo de germinación en el segundo experimento

Tiempo (horas)	Concentración (%)	Hormonal	Viabiles (%)	Viabiles, Bajo vigor (%)	No viabiles (%)
30	0.00	Agua	93.00	7.00	0.00
		AG	95.00	5.00	0.00
	6.25	Agua	94.00	6.00	0.00
		AG	98.00	1.00	1.00
	12.50	Agua	85.00	8.00	7.00
		AG	90.00	10.00	0.00
	18.75	Agua	77.00	23.00	0.00
		AG	100.00	0.00	0.00
	25.00	Agua	100.00	0.00	0.00
		AG	100.00	0.00	0.00
		Promedio	93.00	6.00	1.00
	60	0.00	Agua	82.00	18.00
AG			71.00	29.00	0.00
6.25		Agua	87.00	13.00	0.00
		AG	88.00	12.00	0.00
12.50		Agua	85.00	15.00	0.00
		AG	100.00	0.00	0.00
18.75		Agua	100.00	0.00	0.00
		AG	100.00	0.00	0.00
25.00		Agua	100.00	0.00	0.00
		AG	100.00	0.00	0.00
		Promedio	91.00	9.00	0.00

4.2 DESCRIPCIÓN HISTOLÓGICA DE LA SEMILLA DE *Capparis spinosa*

La semilla de alcaparra es reniforme con una longitud entre dos y tres milímetros en su máxima dimensión con un color marrón oscuro cuando llega a la madurez. En el perímetro de la cubierta se observa una cicatriz redondeada y arrugada que corresponde al hilo, rodeado por un reborde algo elevado, de color más claro que el de la testa (fotografías 4.2 y 4.3) coincidiendo con la descripción de Besnier (1989).

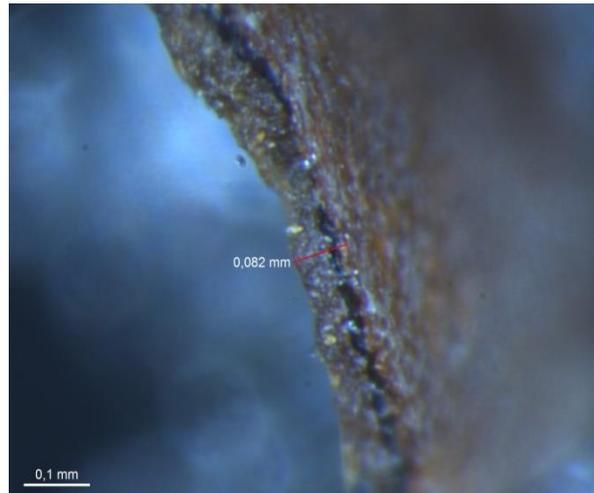


Fotografía 4.2 Vista exterior de semilla madura de *Capparis spinosa* observado a 12.5 aumentos con lupa marca Leica.

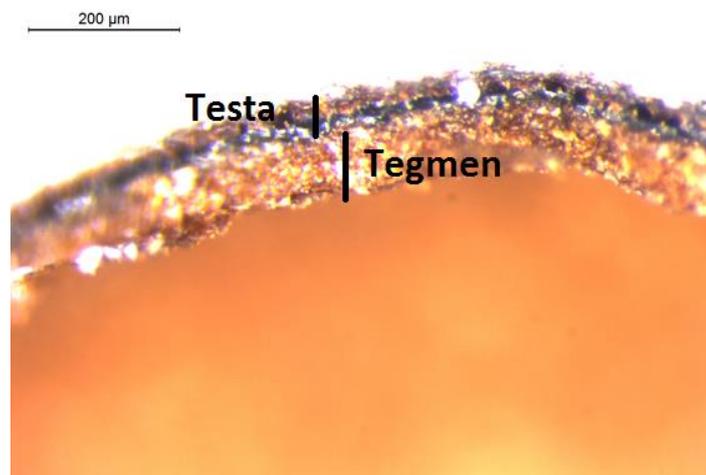


Fotografía 4.3 Presencia del hilo en la cubierta de *Capparis spinosa* observado a 80 aumentos con lupa marca Leica.

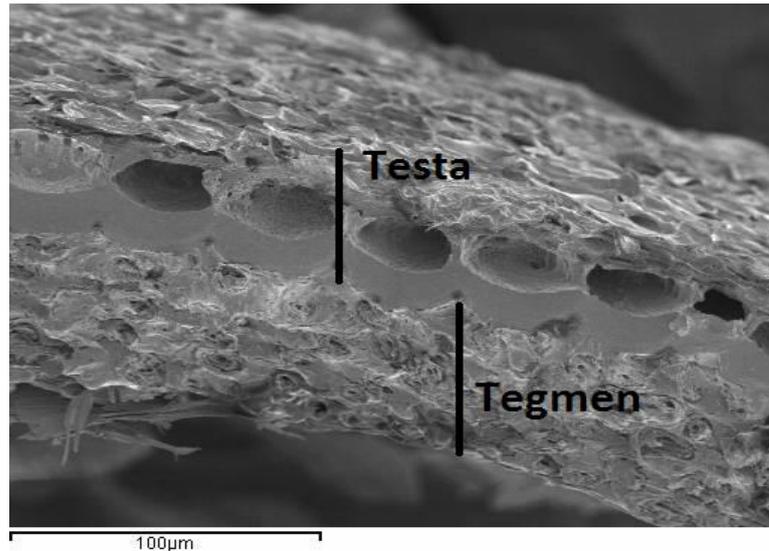
La cubierta de la semilla de alcaparra tiene un espesor de aproximadamente 80 micras (fotografía 4.4). En ella se puede apreciar una capa de color oscuro que divide en dos estructuras a la cubierta. Corner (1976) señala la existencia de un tegumento externo que se presenta como una empalizada desigual de células cilíndricas con paredes más o menos espesas que correspondería a la testa, mientras que el tegumento interno más o menos lignificado con paredes fibrosas constituiría el tegmen como se aprecia en las fotografías 4.5 y 4.6.



Fotografía 4.4 Corte longitudinal de la cubierta de alcaparra observado a 8 aumentos con lupa marca Leica.

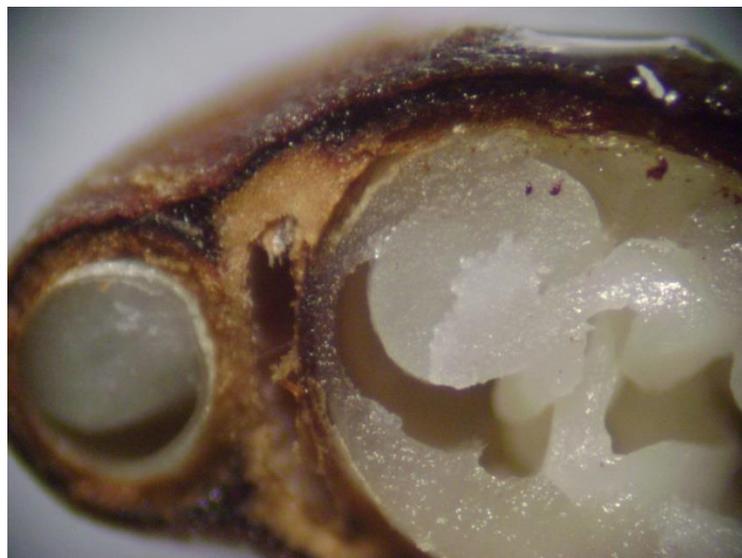


Fotografía 4.5 Corte longitudinal de la cubierta de alcaparra observado a 80 aumentos con lupa marca Leica

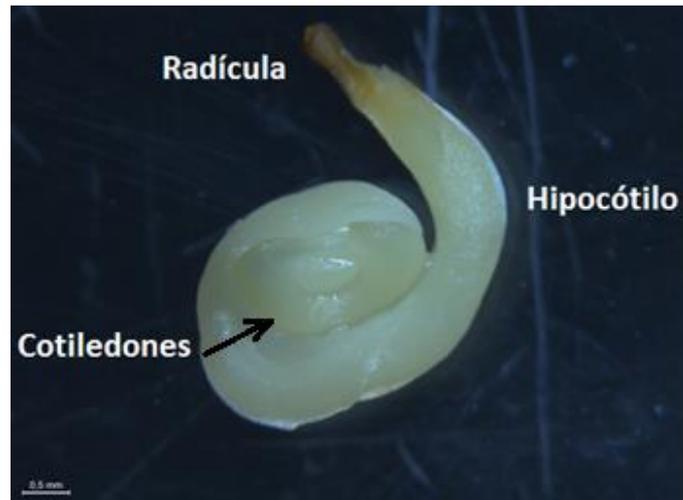


Fotografía 4.6 Corte longitudinal de la cubierta de alcaparra observado a 500 aumentos con microscopio electrónico de barrido marca JEOL

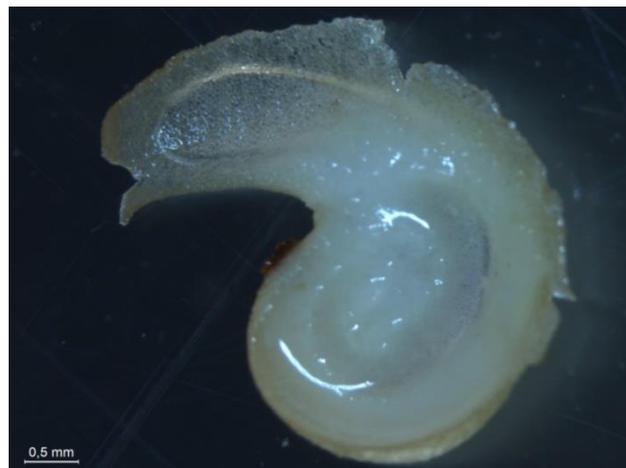
Realizando un corte longitudinal en semillas maduras y secas (fotografía 4.7), se observa la radícula, parte de la envoltura, que corresponde al mesotegmen y endotegmen [Corner, 1976; denominada también tercer tegumento (Orr, 1921)] y parte de los cotiledones. El embrión y su envoltura se presentan en las (fotografías 4.8 y 4.9) respectivamente.



Fotografía 4.7 Corte longitudinal en semillas maduras y secas de alcaparra observado a 13 aumentos con lupa marca Euromex



Fotografía 4.8 Cotiledones, hipocótilo, radícula y parte de la envoltura del embrión de alcaparra observado a 8 aumentos con lupa marca Leica



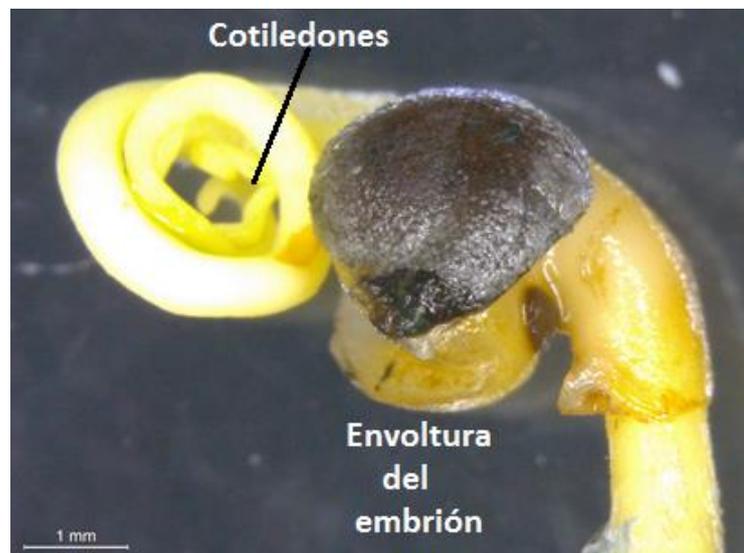
Fotografía 4.9 Envoltura del embrión que corresponde al meso y endotegmen observado a 12.5 aumentos con lupa marca Leica

En la fotografía 4.10 se aprecia a los cotiledones enrollados, así como la envoltura embrional.



Fotografía 4.10 Cotiledones, hipocótilo, radícula y envoltura del embrión observado a 10 aumentos con lupa marca Euromex

En la fotografía 4.11 se aprecia a los cotiledones medianamente desplegados así como la envoltura embrional adherida a una de las cubiertas de la semilla, desde la cual el hipocótilo se proyecta.



Fotografía 4.11 Cotiledones y envoltura del embrión observado a 12.5 aumentos con lupa marca Leica

5. CONCLUSIONES

- La escarificación enzimática con el complejo *Trichoderma reesei* es un método adecuado para mejorar la germinación de las semillas de *Capparis spinosa*, consiguiendo escarificar la cubierta sin dañar el embrión, por lo que germinan prácticamente todas las semillas viables. El porcentaje de germinación conseguido depende de la concentración del complejo enzimático y de la duración del tratamiento.
- Las concentraciones del complejo enzimático de *Trichoderma reesei*, que se utilizaron en los dos experimentos, resultaron adecuadas para el peso de las semillas de alcaparra que fueron escarificadas.
- La Driselasa se comporta como un escarificador adecuado, sin llegar a alcanzar los niveles de *Trichoderma reesei*.
- La escarificación provoca una disminución del contenido en celulosa, hemicelulosa y lignina en las semillas y la presencia de sólidos solubles totales en la solución del complejo enzimático.
- La temperatura, el pH, el volumen de la solución y el peso de las semillas, fueron adecuados para conseguir la actividad enzimática del complejo de *Trichoderma reesei*.
- A pesar de que los porcentajes de germinación conseguidos con el complejo *Trichoderma reesei* son muy elevados, la aplicación posterior de AG al sustrato de germinación consigue aumentarlos.
- Se han descrito las principales partes de la semilla en distintos estadios de la germinación.

6. REFERENCIAS

- Al-Mahmood, H. J., Shatnawi, M. A., Shibli, R. A., Makhadmeh, I. M., Abubaker, S. M., & Shadiadeh, A. N. (2012). Clonal propagation and medium-term conservation of *Capparis spinosa*: A medicinal plant. *Journal of Medicinal Plants Research*, 6: 3826-3836.
- Al-Safadi, B., & Elias, R. (2011). Improvement of caper (*Capparis spinosa* L.) propagation using in vitro culture and gamma irradiation. *Scientia Horticulturae*, 127 (39): 290-297.
- Alvira, P., Tomás-Pejó, E., Ballesteros, M., & Negro, M. (2010). Pretreatment technologies for an efficient bioethanol production process based on enzymatic hydrolysis: A review. *Bioresource Technology*, 101: 4851-4861.
- Argentieri, M., Macchia, F., Papadia, P., Fanizzi, F., & Avato, P. (2012). Bioactive compounds from *Capparis spinosa* subsp. *rupestris*. *Industrial Crops and Products*, 36: 65-69.
- Arslan, R., Bektas, N., & Ozturk, Y. (2010). Antinociceptive activity of methanol extract of fruits of *Capparis ovata* in mice. *Journal of Ethnopharmacology*, 131(1): 28-32.
- Bahrani, M. J., Ramazani Gask, M., Shekafandeh, A., & Taghvaei, M. (2008). Seed germination of wild caper (*Capparis spinosa* L., var. *parviflora*) as affected by dormancy breaking treatments and salinity levels. *Seed Science & Technology*, 36 (3): 776-780.
- Bektas, N., Arslan, R., Goger, F., Kirimer, N., & Ozturk, Y. (2012). Investigation for anti-inflammatory and anti-thrombotic activities of methanol extract of *Capparis ovata* buds and fruits. *Journal of Ethnopharmacology*, 142 (1): 45-52.
- Bewley, D., & Black, M. (1994) *Seeds Physiology of development and germination*. New York: Plenum Press.
- Blakesley, D., Weston, G. D., & Elliott, M. C. (1991). Endogeneous levels of indole -3-acetic acid and abscisic acid during the rooting of *Cotinus coggygria* cuttings taken at different times of the year. *Plant Growth Regulation*, 10 (1): 1-12.

- Caboni, P., Sarais, G., Aissani, N., Tocco, G., Sasanelli, N., & Liori, B. (2012). Nematicidal Activity of 2-Thiophenecarboxaldehyde and Methylisothiocyanate from Caper (*Capparis spinosa*) against *Meloidogyne incognita*, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60 (30): 7345-7351.
- Carra, A., Del Signore, M. B., Sottile, F., Ricci, A., & Carimi, F. (2012). Potential use of new diphenylurea derivatives in micropropagation of *Capparis spinosa* L. *Plant Growth Regulation*, 66 (3): 229–237.
- Corner, E. (1976). *The seeds of dicotyledons*. Cambridge: Cambridge University Press
- Costa, R., & Rossi, M. (2005). *Alcaparras*. Buenos Aires: Universidad del CEMA.
- Eddouks, M., Lemhadri, A., & Michel, J. (2005). Hypolipidemic activity of aqueous extract of *Capparis spinosa* L. in normal and diabetic rats. *Journal of Ethnopharmacology*, 98 (3): 345-350.
- Fernández, F., Rodríguez, A., & Prohens, T. (2008). *Genética y mejora vegetal*. Valencia: Editorial UPV.
- Germanà M. A., & Chiancone, B. (2008). In vitro germination and seedling development of *Caper (Capparis spinosa* L.) mature seeds. *International Symposium on Biotechnology of Fruit Species: Biotechfruit 839*: 181-186.
- Haque, M., Haque, M. E., Mukhlesur, R., Rahman, M., Khondkar, P., & Wahed I. (2004). E-octadec-7-en-5-ynoic acid from the roots of *Capparis zeylanica*. *Fitoterapia*, 75: 130-133.
- Haque, M., Haque, M.E., Rahman, M.M., Khondkar, P., & Rahman, M.M. (2008). Antibacterial and Cytotoxic Activities of *Capparis zeylanica* Linn Roots. *Ars Pharmaceutica*, 49 (1): 5-11.
- Hartmann, H., Kester, F., Davies, F., & Geneve, R. (2002). *Plant propagation: Principles and Practices*. New Jersey: Prentice-Hall
- Hatakeyama, H., & Hatakeyama, T. (2010). Lignin structure, properties and applications. *Advances in Polymer Science*. 232: 1-63
- International Seed Testing Association (1999). International Rules for Seed Testing. Rules 1999. *Seed Science and Technology*, 27, Supplement.

- Kumar, R., Singh, S., & Singh, O. (2008). Bioconversion of lignocellulosic biomass: biochemical and molecular perspectives. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 35: 377-391.
- Ladhari, A., Omezzine, F., Dellagrecia, M., Zarrelli, A., & Haouala, R. (2013). Phytotoxic activity of *Capparis spinosa* L. and its discovered active compounds. *Allelopathy Journal*, 32(2): 175-190.
- Latsague, M., Sáez, P., & Hauenstein, E. (2008). Induction of rooting in cuttings of *Berberidopsis corallina* with indol butyric acid. *Bosque*, 29 (3): 227-230.
- Latsague, M., Sáez, P., & Yáñez, J. (2009). Indole butyric acid effect on rhizogenic capacity of *Eucryphia glutinosa* cuttings. *Bosque*, 30 (2): 102-105.
- Luna, F., & Pérez, M. (1985). *La Tapenera o Alcaparra*. Madrid: MAGRAMA.
- Macchia, M., & Casano, S. (1993) La propagazione del cappero (*Capparis spinosa* L.) *Sementi Elette*, 39: 39-42.
- Melgarejo, P. (2000). *Tratado de fruticultura para zonas áridas y semiáridas*. Madrid: Mundiprensa.
- Orphanos, P.I. (1983) Germination of caper (*Capparis spinosa* L.) seeds. *Journal of Horticultural Science*, 58: 267-270.
- Ortega, N., Busto, M., & Pérez-Mateos M. (2001). Kinetics of cellulose saccharification by *Trichoderma reesei* cellulose. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 47: 7-14.
- Park, I., Kim, I., Kang, K., Sohn, H., Rhee, I., Jin, I., & Jang, H. (2010). Cellulose ethanol production from waste newsprint by simultaneous saccharification and fermentation using *Saccharomyces cerevisiae* KNU5377. *Process Biochemistry*, (45): 487-492.
- Pascual, B., San Bautista, A., Ferreros, N., López-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.

- Pascual, B., San Bautista, A., Imbernón, A., López-Galarza, S., Alagarda, J., & Maroto, J. (2004). Seed treatments for improved germination of caper (*Capparis spinosa*). *Seed Science & Technology*, 32: 637-642.
- Pascual, B., San Bautista, A., López-Galarza, S., Alagarda, J., & Maroto, J. V. (2006). Germination behaviour after storage of caper seeds. *Seed Science & Technology*, 34: 151-159.
- Pascual, B., San Bautista, A., Pascual-Seva, N., García Molina, R., López-Galarza, S., & Maroto, J. (2009). Effects of soaking period and gibberellic acid addition on caper seed germination. *Seed Science & Technology*, 37: 33-41.
- Rinaldelli, E. (2000) Effect of ultrasonic waves on seed germination of *Capparis spinosa* L. as related to exposure time, temperature, and gibberellic acid. *Advances in Horticultural Science*, 14: 182-188.
- Saifi, N., Ibijbijen, J., & Echchgadda, G. (2013). In vitro propagation via seeds of *Capparis ovata* Desf. *African Journal of Biotechnology*, 12 (21): 3235-3238.
- Sarragiotto, M., Nazari, A., Lins de Oliveira, M., Ferreira da Costa, W., & Conceição de Souza, M. (2004). Prolinebetaine, N-methylproline, 3-carbomethoxy-N-methylpyridinium and kaempferol 3,7-dirhamnoside from *Capparis humilis*. *Biochemical Systematics and Ecology*, 32: 505-507.
- Sigma-Aldrich. (10 de agosto de 2015). Driselase Basidiomycetes sp. Obtenido de <http://www.sigmaaldrich.com>
- Sigma-Aldrich. (10 de agosto de 2015). Cellulase from *Trichoderma reesei* ATCC 26921. Obtenido de <http://www.sigmaaldrich.com>
- Soyler, D., & Khawar, K. M. (2007). Seed Germination of caper (*Capparis ovata* var. Herbacea) using α naphthalene acetic acid and gibberellic acid. *International Journal of Agricultural & Biology*, 9: 35-37.
- Sozzi, G., & Chiesa, A. (1995). Improvement of caper (*Capparis spinosa* L.) seed germination by breaking seed coat-induced dormancy. *Scientia Horticulturae*, 62: 255-261.

- Statistical Graphics Corporation (2011) Statgraphics Centurion XVI. Statistical Graphics, Rockville, Maryland, USA
- Suleiman, M., Bhat, N., Abdal, M., Jacob, S., Thomas, R., & Al-Dossery, S. (2009). Germination studies of *Capparis spinosa* L. *Propagation of Ornamental Plants*, 1: 35-38.
- Taiz, L., & Zeiger, E. (2002). *Fisiología vegetal* (Vol. II). Castelló de la Plana: Universitat Jaume I.
- Tansi, S. (1999) Propagation methods for caper (*Capparis spinosa* L.) seeds. *Agricultura Mediterránea*, 23: 45-49.
- Tlili, N., Walid, E., Ezzeddine, S., Abdelhamid, K., Saida, T., & Nizar, N. (2011). The caper (*Capparis* L.): Ethnopharmacology, phytochemical and pharmacological properties. *Fitoterapia*, 93-101.
- Tyagi, P., & Kothari, S.L. (1997). Micropropagation of *Capparis decidua* through In Vitro Shoot Proliferation on Nodal Explants of Mature Tree and Seedling Explants. *Journal of Plant Biochemistry & Biotechnology*, 6 (1): 19-23.
- Van Soest, P. V., Robertson, J. B., & Lewis, B. A. (1991). Methods for dietary fiber, neutral detergent fiber, and non starch polysaccharides in relation to animal nutrition. *Journal of Dairy Science*. 74 (10): 3583-3597
- Vilela, A., & Raveta, D. (2001). The effect of seed scarification and soil-media on germination, growth, storage, and survival of seedlings of five species of *Prosopis* L. (Mimosaceae). *Journal of Arid Environments*, 48: 171-184.
- Xiao, P., Tao, W., Miriban, A., Zhen, S., Xue, L., & Haji, A. (2008). New spermidine alkaloids from *Capparis spinosa* roots. *Phytochemistry Letters*, 59-62.
- Yang, T., Wang, C. H., Chou, G. X., Wu, T., Cheng, X. M., & Wang, Z. T. (2010). New alkaloids from *Capparis spinosa*: Structure and X-ray crystallographic analysis. *Food chemistry*, 123(3): 705-710.
- Yildirim, Z. (1998) Studies on the improvement of seed germination in caper. *Turk Journal of Field Crops*, 3, 21-24.