



UNIVERSITAT
POLITÈCNICA
DE VALÈNCIA

DEPARTAMENTO DE PRODUCCIÓN VEGETAL

Estudio para la mejora de las técnicas de propagación de la alcaparra (*Capparis spinosa* L.)

TESIS DOCTORAL

**Presentada por:
D. Mariano Juan Ferrer**

**Dirigida por:
Dr. Bernardo Pascual España
Dra. Nuria Pascual Seva**

Valencia, 2017

Agradecimientos

*Quiero expresar mi agradecimiento a todas aquellas personas que, de una forma u otra, han contribuido a la realización de esta Tesis Doctoral. No quiero olvidarme de mis compañer@s y excompañer@s del Departamento de Producción Vegetal y del Departamento de Ecosistemas Agroforestales que me habéis ayudado desinteresadamente o, simplemente, por vuestro ánimo y amistad. A mis alumnos Josep, Belén, Agustín, Bolívar, David, Antoine y Noelia, por ayudarme en las largas jornadas de evaluación de resultados. A los profesores Francisco Javier Esteras por el asesoramiento en la clasificación botánica, M^a Pilar Santamarina y Francisco José García Breijo por vuestros consejos en la parte de Anatomía e Histología, Alejandro Atarés y Vicente Moreno por vuestra colaboración en el cultivo *in vitro*. A Daniel Siurana y Daniel Vaño que sin vuestros cuidados, las pequeñas plantas de alcaparras, no habrían sobrevivido. A los técnicos de laboratorio, Amparo y Vicente. A José Oliver que, sin duda, su labor como celestino al presentarme las alcaparras fue crucial para que me enamorara de estas plantas. A todos muchas gracias.*

Agradecer de forma especial a los profesores Bernardo Pascual España y Nuria Pascual Seva, directores de ese trabajo, la confianza depositada en mí. Gracias por ayudarme siempre, con dedicación y esfuerzo,

en las largas jornadas que hemos compartido. En los momentos más difíciles, que los ha habido, siempre he encontrado vuestro apoyo, confianza, afecto y cordialidad, como pilares fundamentales de esta Tesis. Vuestras enseñanzas y el trato recibido me han ayudado a crecer tanto técnica como humanamente. Gracias.

Por último, no encuentro palabras que puedan expresar toda mi gratitud a mi familia por su apoyo incondicional, por su tolerancia en momentos decisivos y por su valiosa y desinteresada ayuda. Iván, no debes estar celoso porque haya pasado más tiempo con "TESIS" que contigo. Algún día podrás comprender cuando "mamá" te decía que estaba con "TESIS" y tú le contestabas llorando que "Papá" estaba sólo frente al ordenador. Carmen, Iván y Pau, espero que algún día podáis perdonarme por el tiempo que os he robado. Gracias.

A Carmen, mi mujer y compañera

A Iván y Pau, nuestros hijos

A LES VERDES TAPARERES DE CAMPOS

Vull cantar la taparera,
verda, de grossa esponera,
que neix i adorma el bell pla
de Campos; oh galania!
flors humil de pagesia
planta de la nostra llar.

És nostra. És campanera,
és verda just la figuera
i gentil com el roser,
dalt el rostoll creix ufana
i en l'estiu dins la solana
emmantella el sementer.

Tres mesos és primavera,
s'extén fresca i riolera
enflairant l'aire subtil;
de bon matí és collida
per fadrina etxerevida,
guapa com el mes d'Abril.

Adornamenta en filera
els marges su ran vorera
del nostres camins veïnals,
quan el sol bofega i crema
l'abella entona un poema
xupant ses flors virginals.

Si la color despera
i el sol en gran torrentera
ens pica i crema tan fort,
s'eixempla tota galana,
és doble verda i més sana
per les andanes de l'hort.

És nostra planta senyera,
de les dones és pradera
lladriola i gran cabdal,
¡quantes joies s'han comprades
al cap de les temporades
per lluir en la festa anyal!

Flairosa, agra i encisera,
humil flor de taperera
que han jugat amb tu els infants
de Campos, fent-ne corones,
tan belles i galanxones
com a joies radiants.

Oh floreta rapissera!
tens mel just la de casera,
dolça com a romaní,
que de pics jo n'he xupades
venint de les passatjades
tes flors su ran del camí.

Quan no canten ja dins l'era
i redola volendera
la fulla pels sementers
ve ja Santa Catalina
la festa, i amb ta branca fina
fan gran foc els campaners.

Taparera campanera,
coneguda temps enrera,
que cita Plini el romà
i Dioscòrides de Grècia,
naturalista que aprecia
l'abundor del nostre pla.

Fou el grec, raça guerrera,
que sembrà en la sementera
la kapparis tropical?
O va ésser el moro noble
l'introductor dins el poble
d'aquest fruit tan estival?

Por ésser humil quimera,
lo cert és, que en la ribera
del terme immens campaner,
hi neix fèrtil i abundosa
eixa planta esponerosa,
verda con el taronger!

(Poema popular de Campos. Mallorca)

“A Campos ses campaneres/
quan han acabat de segar/
se’n van a arrossegar/
es cul per ses tapereres”

(Canción popular)

RESUMEN

La alcaparra (*Capparis spinosa* L.) es una planta cultivada especialmente por sus botones florales (alcaparras), que están incluidos en la dieta mediterránea. Las principales zonas productoras se encuentran en los ambientes más desérticos de Marruecos, Península Ibérica, Turquía y las islas italianas de Pantelleria y Salina.

En los últimos años, la demanda de alcaparras en el mercado internacional ha aumentado considerablemente, ofreciendo unas excelentes perspectivas, aunque la superficie cultivada no se ha visto incrementada en la misma medida. El principal inconveniente que se presenta, además del elevado requerimiento de mano de obra para su recolección, es la propagación de las plantas, lo que ha impedido aumentar esta superficie. Por este motivo se inició una línea de investigación, en la que se engloba la presente tesis doctoral, para mejorar las técnicas de propagación de esta planta. El objetivo general de esta tesis doctoral es establecer las pautas para la obtención de una propagación viable de *C. spinosa*, a través de las técnicas utilizadas habitualmente en los viveros.

En cuanto a la propagación sexual se incide en los aspectos que han sido menos estudiados hasta la fecha, como la viabilidad y el deterioro de las semillas durante el almacenamiento, la imbibición, necesaria para la germinación de las semillas, y que potencialmente podría ser la causa de los bajos porcentajes de germinación, el efecto de dos métodos de escarificación, y de la estratificación sobre la viabilidad y germinación de las semillas. De los distintos estudios incluidos en este apartado de la tesis doctoral se concluye que realizando los ensayos de germinación inmediatamente después de la recolección se pueden alcanzar porcentajes de germinación cercanos al 100%, con la adición de AG₃, que en todos los casos analizados ha adelantado y aumentado la germinación. La germinación de las semillas disminuye al aumentar el periodo de almacenamiento, y a partir del cuarto año aumenta el tiempo necesario para que se alcance el 50% de la germinación. Se ha determinado el periodo de viabilidad media, que está entre 4 y 4.5 años. La cubierta de la semilla permite el paso del agua hasta el endospermo,

(probablemente a través de una discontinuidad de la capa de células con las paredes tangenciales engrosadas de la testa, que se observa en la hendidura), observándose un incremento de humedad del mismo a las 48 h de estar a remojo, por lo que no puede afirmarse que la cubierta de estas semillas sea impermeable, al menos totalmente, y por tanto tampoco que presenten latencia física. De los distintos métodos de escarificación ensayados, el que mejores resultados ha obtenido ha sido la incubación con el complejo *Trichoderma reesei*, que provoca una disminución del contenido en celulosa, hemicelulosa y lignina de las semillas, consiguiendo la escarificación de la cubierta sin dañar el embrión. La estratificación de las semillas, tanto refrigerada como cálida ha conseguido adelantar y aumentar la germinación.

En el apartado de la propagación vegetativa se estudia la influencia de las características de las estaquillas utilizadas, grado de lignificación, diámetro y posición en la rama de donde se obtiene la estaquilla, en el prendimiento de las mismas, así como la utilización de diversas técnicas con el objetivo de mejorar el prendimiento. Los mejores resultados se han obtenido cuando el estaquillado se ha realizado en el momento próximo a la brotación (estado de yema hinchada, marzo en las condiciones de Valencia). La propagación a través de estaquillas lignificadas (parcial o completamente) sólo es viable cuando las mismas proceden de la parte basal de la rama, o en caso de que exista una yema de su zona apical. Las estaquillas poco lignificadas de la zona central de la rama sólo enraízan, pero no brotan debido a que sus yemas han dado lugar previamente a flores o brotes, no presentando yemas latentes. Los mejores resultados de prendimiento en las estaquillas lignificadas se han obtenido con los mayores diámetros, mientras que, en estaquillas no lignificadas, se han obtenido mejores resultados con los diámetros menores. Respecto a las distintas técnicas ensayadas para mejorar el prendimiento de las estaquillas se observa que con el tratamiento con bajas temperaturas antes de su plantación, el sellado de los dos extremos de las estaquillas con masilla para injertos y el lesionado de la base de las estaquillas, tanto cortes a la corteza, como eliminación de parte de la misma, mejoran los resultados de prendimiento.

RESUM

La tàpera (*Capparis spinosa* L.) és una planta conreada especialment pels seus botons florals (tàperes), que estan inclosos en la dieta mediterrània. Les principals zones productores es troben en els ambients més àrids del Marroc, Península Ibèrica, Turquia i les illes italianes de Pantelleria i Salina.

En els últims anys, la demanda de tàperes en el mercat internacional ha augmentat considerablement, oferint unes excel·lents perspectives, encara que la superfície conreada no s'ha vist incrementada en la mateixa mesura. El principal inconvenient que es presenta, a més de l'elevat requeriment de mà d'obra per a la seva recol·lecció, és la propagació de les plantes, el que ha limita el creixement d'aquesta superfície. Per aquest motiu es va iniciar una línia d'investigació, en la qual s'engloba la present tesi doctoral, per millorar les tècniques de propagació del cultiu. L'objectiu general d'aquesta tesi doctoral és establir les pautes per a l'obtenció d'una propagació assequible de *C. spinosa*, a través de les tècniques utilitzades habitualment en els vivers.

Pel que fa a la propagació sexual s'incideix en els aspectes que han estat menys estudiats fins ara, com la viabilitat i el deteriorament de les llavors durant l'emmagatzematge, la imbibició, necessària per a la germinació de les llavors, i que potencialment podria ser la causa dels baixos percentatges de germinació, l'efecte de dos mètodes d'escarificació, i de l'estratificació sobre la viabilitat i germinació de les llavors. Dels diferents estudis inclosos en aquest apartat de la tesi doctoral es conclou que realitzant els assajos de germinació immediatament després de la recol·lecció es poden assolir percentatges de germinació propers al 100%, amb l'addició de AG₃, amb el que s'aconsegueix avançar i augmentar la germinació. La germinació de les llavors disminueix al augmentar el període d'emmagatzemament, i a partir del quart any augmenta el temps necessari per a arribar al 50% de la germinació. S'ha determinat el període de viabilitat mitjana de lots de llavors de producció pròpia, que està entre 4 i 4.5 anys. S'ha comprovat que la coberta de la llavor permet el pas de l'aigua fins a l'endosperma, a través de la discontinuïtat de l'exotegmen, junt a l'hilum, comprovant-

se un increment d'humitat del mateix a les 48 h d'estar en remull, per la qual cosa no es pot afirmar que la coberta d'aquestes llavors sigui impermeable, almenys totalment, i per tant tampoc que presenten latència física. Dels diferents mètodes d'escarificació assajats, el que millors resultats ha obtingut ha estat la incubació amb el complex *Trichoderma reesei*, que provoca una disminució del contingut en cel·lulosa, hemicel·lulosa i lignina de les llavors, aconseguint l'escarificació de la coberta sense danyar l'embrió. Amb l'estratificació càlida de les llavors s'ha aconseguit augmentar i avançar la germinació, fet que també s'ha aconseguit, encara que en menor mesura, amb l'estratificació refrigerada

En l'apartat de la propagació vegetativa s'estudia la influència de les característiques de les estaquetes utilitzades, com el grau de lignificació, el diàmetre i la posició en la branca d'on s'obté la estaqueta, sobre el la brotació i arrelament de les mateixes, així com la utilització de diverses tècniques amb l'objectiu de millorar brotació i arrelament. Els millors resultats s'han obtingut quan el estaquejat s'ha realitzat després de la parada vegetativa immediatament abans de la brotada de les gemmes (març a les condicions de València). La propagació a través d'estaquetes de fusta dura o semidura és possible quan les mateixes procedeixen de la part basal de la branca, sent únicament viables les de la posició central de la branca quan està present alguna gemma latent. Les estaquetes de fusta semidura de la zona central de la branca s'arrelen amb relativa facilitat, però no desenvolupen part aèria a causa de que les seues gemmes han donat lloc prèviament a flors o brots, no presentant gemmes latents. Els millors resultats de brotació i d'arrelament de les estaquetes de fusta dura s'han obtingut amb els majors diàmetres, mentre que, en estaquetes de fusta semidura, s'han obtingut millors resultats amb els diàmetres menors. Respecte a les diferents tècniques assajades per millorar la brotació i l'arrelament de les estaquetes, amb el tractament amb baixes temperatures abans de la seva plantació, el segellat dels dos extrems de les estaquetes amb massilla per a empelts, i el lesionat de la base de les estaquetes, milloren els resultats de brotació i arrelament.

ABSTRACT

Caper (*Capparis spinosa* L.) is a plant cultivated especially for its flower buds (capers), which are included in the Mediterranean diet. The main producing areas are in the more arid environments of Morocco, Iberia, Turkey and the Italian islands of Pantelleria and Salina.

In recent years, the demand for capers in the international market has increased considerably, offering excellent perspectives, although the cultivated area has not been increased to the same extent. One of the main drawbacks for its cultivation, in addition to the high labour demand for harvesting, is the difficulty of plant propagation, which has limited the increment of the cultivated area. For this reason, a line of research was initiated, in which the present PhD thesis is framed, to improve the propagation techniques of the crop. The general objective of this PhD thesis is to establish the guidelines for obtaining an affordable propagation of *C. spinosa*, through the techniques that are commonly used in nurseries.

Regarding to sexual propagation, the thesis deals with the aspects that have been less studied to date, such as the viability and deterioration of seeds during storage, imbibition, which is necessary for the germination of seeds, and that could potentially be the cause of the low germination percentages, and the effects of two scarification and stratification methods on seed germination and viability. From the different studies included in this section of the thesis it is concluded that by carrying out the germination tests immediately after the seed collection, germination percentages close to 100% can be reached, with the addition of AG₃ to the substrate, with which it is possible to increase and to advance the germination. Germination of seeds decreases with increasing storage period, and from four years, increases the necessary period to reach 50% of germination. It has been determined the longevity of seeds belonging to lots of own production, which is between 4 and 4.5 years. It has been verified that the cover of the seed allows the entry of the water to the endosperm, through the discontinuity of the exotegmen next to the hilum. Furthermore, it has been verified an increase of the humidity of the endosperm after 48 h

of soaking, reason why that it cannot be said that the cover of these seeds is impermeable, at least totally, and therefore it cannot be stated that they present physical dormancy. Of the scarification methods tested, the best result has been obtained with the incubation with the *Trichoderma reesei* complex, which causes a decrease in the cellulose, hemicellulose and lignin contents of the seeds, without damaging the embryo. With the warm stratification of the seeds it has been possible to increase and advance germination, which has also been achieved, but to a lesser extent, with the refrigerated stratification.

In the vegetative propagation section, the influence of the characteristics of the cuttings used, such as the degree of lignification, the diameter and the position in the branch from which the cutting is obtained, is studied, in the rooting and shooting of the cuttings, as well as the use of various techniques with the aim of improving the rooting and shooting. The best results were obtained when the cutting was performed after the vegetative stop, immediately before bud sprouting (March in Valencia conditions). Propagation through hardwood or semi-hardwood cuttings is possible when they come from the basal part of the branch. Cuttings from the central position of the branch are only viable when a latent bud is present. The semi-hard wood cuttings of the central zone of the branch rooted with relative ease, but they do not develop aerial part because their buds have previously given rise to flowers or buds, not presenting latent buds. The best rooting and shooting results in hardwood cuttings have been obtained with the largest diameters, whereas, in semi-hardwood cuttings, better results have been obtained with the smaller diameters. In relation to the different techniques tested to improve the rooting and shooting of the cuttings, the treatment with low temperatures before planting, the sealing of the two ends of the cuttings with putty for grafting, and the injury of the base of the cuttings, led to improved results.

INDICE

Pág.

1. INTRODUCCIÓN GENERAL.....	1
1.1. EVOLUCIÓN HISTÓRICA DE <i>Capparis</i> spp.....	5
1.2. BOTÁNICA	15
1.2.1. Taxonomía y distribución	15
1.2.2. Morfología y anatomía.....	18
1.3. ECOFISIOLOGIA.....	25
1.3.1. Requisitos medioambientales	25
1.3.2. Mecanismos de adaptación al estrés hídrico y suelos pobres	35
1.4. PLANTACIÓN Y LABORES DE CULTIVO	37
1.4.1. Ecotipos.....	37
1.4.2. Propagación	39
1.4.2.1. Propagación sexual	40
1.4.2.2. Propagación vegetativa	42
1.4.3. Labores de cultivo	44
1.4.3.1. Establecimiento de la plantación.....	44
1.4.3.2. Poda	48
1.4.3.3. Nutrición y Fertilización	48
1.4.3.4. Riego	49
1.4.3.5. Plagas y enfermedades.....	49
1.4.3.6. Recolección y rendimiento	51
1.5. POSTCOSECHA	59
1.5.1. Alcaparras	59
1.5.2. Alcaparrones	63
1.6. COMPOSICIÓN Y APROVECHAMIENTOS.....	65
1.6.1. Composición.....	65
1.6.2. Aprovechamientos e industrialización	67
1.6.2.1. Uso alimentario	68
1.6.2.2. Uso ornamental	72
1.6.2.3. Uso medicinal y cosmético	75
1.6.2.4. Valor ecológico y ambiental	77
1.7. IMPORTANCIA ECONÓMICA.....	79
1.7.1. Producción mundial	80
1.7.2. Comercio exterior	83
1.7.3. Comercio nacional.....	85

1.8. OBJETIVOS GENERALES	87
1.8.1. Antecedentes	87
1.8.2. Objetivos	87
2. PROPAGACIÓN SEXUAL	89
2.1. INTRODUCCIÓN	91
2.1.1. La semilla.....	91
2.1.3. La latencia de las semillas	101
2.1.3.1. Latencia primaria y secundaria	102
2.1.3.2. Tipos de latencia	104
2.1.3.3. Adquisición y rotura de la latencia	114
2.1.4. Deterioro y longevidad de las semillas.....	116
2.1.4.1. Factores que afectan al deterioro de las semillas durante el almacenamiento	117
2.1.4.2. Cinética del deterioro	119
2.1.4.2.1. Temperatura de almacenamiento.....	121
2.1.4.2.2. Contenido de agua en el almacenamiento	121
2.1.4.2.3. Interacciones contenido hídrico-temperatura	126
2.1.4.3. Prevención del deterioro	129
2.1.4.4. Reacciones del deterioro	130
2.1.4.4.1. Reacciones físicas involucradas en el deterioro	130
2.1.4.4.2. Reacciones químicas involucradas en el deterioro	132
2.1.5. Estudios realizados.....	136
2.2. MATERIAL Y MÉTODOS	137
2.2.1. Material vegetal	137
2.2.2. Ensayos de viabilidad de las semillas	138
2.2.3. Ensayos de germinación de las semillas.....	140
2.2.4. Análisis estadístico	142
2.2.5. Locales.....	143
2.3. HISTOLOGÍA Y ANATOMÍA DE LOS ÓRGANOS REPRODUCTIVOS DE <i>Capparis spinosa</i> L. subsp. <i>rupestris</i>	145
2.3.1. Introducción	145
2.3.2. Material y métodos.....	145
2.3.3. Resultados y discusión	147
2.3.4. Conclusiones	153
2.4. PODER GERMINATIVO DE LAS SEMILLAS DE LAS SUBESPECIES <i>rupestris</i> y <i>spinosa</i> DE <i>Capparis spinosa</i> L.....	155
2.4.1. Introducción	155
2.4.2. Material y métodos.....	156

2.4.3. Resultados y discusión	157
2.4.4. Conclusiones	162
2.5. ANÁLISIS DE LA ABSORCIÓN DE AGUA POR PARTE DE LAS SEMILLAS DE	
<i>Capparis spinosa</i> L. subsp. <i>rupestris</i>	163
2.5.1. Introducción	163
2.5.2. Establecimiento del procedimiento a seguir en el secado de las semillas de alcaparra para la determinación de su humedad	164
2.5.2.1. Material y métodos	164
2.5.2.2. Resultados y discusión	165
2.5.2.3. Conclusiones	167
2.5.3. Análisis de la absorción de agua de las semillas individuales	167
2.5.3.1. Material y métodos	167
2.5.3.2. Resultados y discusión	169
2.5.3.3. Conclusiones	173
2.5.4. Análisis de la absorción de agua de las semillas a nivel de lote	174
2.5.4.1. Introducción	174
2.5.4.1. Material y métodos	174
2.5.4.2. Resultados y discusión	176
2.5.4.3. Conclusiones	183
2.5.5. Análisis de la absorción de agua de semillas escarificadas	184
2.5.5.1. Material y métodos	184
2.5.5.2. Resultados y discusión	184
2.5.5.3. Conclusiones	189
2.5.6. Análisis de la absorción de agua en la cubierta y en el endospermo de las semillas	189
2.5.6.1. Introducción	189
2.5.6.2. Material y métodos	190
2.5.6.3. Resultados y discusión	191
2.5.6.3. Conclusiones	195
2.6. INFLUENCIA DE LA EDAD DE LAS SEMILLAS DE <i>Capparis spinosa</i> L. subsp.	
<i>rupestris</i> EN SU GERMINACIÓN	197
2.6.1. Introducción	197
2.6.2. Análisis de la longevidad de las semillas de <i>C. spinosa</i> L. subsp. <i>rupestris</i> . e influencia de la edad de la semilla en la germinación	198
2.6.2.1. Introducción	198
2.6.2.2. Material y métodos	200
2.6.2.3. Resultados y discusión	201
2.6.2.4. Conclusiones	211

2.6.3. Influencia del período transcurrido desde la recolección de las semillas de <i>C. spinosa</i> L. subsp. <i>rupestris</i> hasta el inicio del ensayo de germinación realizado durante los tres primeros meses tras la recolección	212
2.6.3.1. Introducción	212
2.6.3.2. Material y métodos	213
2.6.3.3. Resultados y discusión	214
2.6.3.4. Conclusiones	221
2.7. INFLUENCIA DEL TRATAMIENTO DE LAS SEMILLAS DE <i>Capparis spinosa</i> L. subsp. <i>rupestris</i> CON RADIACIÓN LÁSER HE-NE E INCUBACIÓN ENZIMÁTICA, EN LA GERMINACIÓN DE LAS MISMAS	223
2.7.1. Introducción	223
2.7.2. Influencia de la radiación láser he-ne sobre la germinación de las semillas de <i>C. spinosa</i> L. subsp. <i>rupestris</i> y el crecimiento de la radícula e hipocótilo	224
2.7.2.1. Introducción	224
2.7.2.2. Material y métodos	225
2.7.2.3. Resultados y discusión	227
2.7.2.4. Conclusiones	236
2.7.3. EFECTO DE LA INCUBACIÓN ENZIMÁTICA EN LA GERMINACIÓN DE LAS SEMILLAS DE <i>Capparis spinosa</i> L. subsp. <i>rupestris</i>	237
2.7.3.1. Introducción	237
2.7.3.2. Material y métodos	245
2.7.3.2.1. Experimento 1. Efecto de los complejos enzimáticos Driselasa y <i>Trichoderma reesei</i>	247
2.7.3.2.2. Experimento 2. Efecto de distintas concentraciones del complejo de <i>Trichoderma reesei</i>	248
2.7.3.3. Resultados y discusión	249
2.7.3.3.1. Experimento 1. Efecto de los complejos enzimáticos Driselasa y <i>Trichoderma reesei</i>	249
2.7.3.3.2. Experimento 2. Efecto de distintas concentraciones del complejo de <i>Trichoderma reesei</i>	262
2.8. EFECTO DE LA ESTRATIFICACIÓN EN LA GERMINACIÓN DE LAS SEMILLAS DE <i>Capparis spinosa</i> L. subsp. <i>rupestris</i>	277
2.8.1. Introducción	277
2.8.2 Efecto de la estratificación refrigerada en la germinación de las semillas de <i>C. spinosa</i> L. subsp. <i>rupestris</i>	279
2.8.2.1. Material y métodos	279
2.8.2.2. Resultados y discusión	281
2.8.2.2.1. Viabilidad y germinación de las semillas	281
2.8.2.2.2. Evolución de del contenido hormonal	288
2.8.2.3. Conclusiones	290

2.8.3. Efecto de la estratificación cálida en la germinación de las semillas de <i>C. spinosa</i> L. subsp. <i>rupestris</i>	290
2.8.3.1. Material y métodos	290
2.8.3.2. Resultados y discusión	291
2.9. DISCUSIÓN GENERAL	297
3. REPRODUCCIÓN ASEJUAL O VEGETATIVA.....	305
3.1. INTRODUCCIÓN	307
3.1.1. Esquejes	307
3.1.2. Micropropagación	311
3.1.3. Injerto	314
3.2. MATERIAL Y MÉTODOS	315
3.2.1. Material vegetal	315
3.2.2. Locales.....	318
3.2.3. Ensayos de estaquillado	320
3.2.4. Análisis estadístico	323
3.3. HISTOLOGÍA Y ANATOMÍA DE LOS ÓRGANOS VEGETATIVOS DE <i>Capparis spinosa</i> L. subsp. <i>rupestris</i>	325
3.3.1. Introducción	325
3.3.2. Objetivos	326
3.3.3. Material y métodos.....	327
3.3.4. Resultados y discusión	327
3.3.5. Conclusiones	337
3.4. INFLUENCIA DE <i>Capparis spinosa</i> L. subsp. <i>rupestris</i> Y <i>Capparis spinosa</i> L. subsp. <i>spinosa</i>, Y DEL ESTADO FENOLÓGICO DE LAS PLANTAS MADRES EN EL PRENDIMIENTO DE LAS ESTAQUILLAS	339
3.4.1. Introducción	339
3.4.2. Objetivos	343
3.4.3. Material y métodos.....	343
3.4.4. Resultados y discusión	345
3.4.5. Conclusiones	351
3.5. EFECTO DE LA POSICIÓN DE LA ESTAQUILLA DENTRO DE LA RAMA DE <i>Capparis spinosa</i> subsp. <i>rupestris</i> SOBRE LA BROTACIÓN.....	353
3.5.1. Introducción	353
3.5.2. Objetivos	354
3.5.3. Material y métodos.....	354
3.5.4. Resultados y discusión	357
3.5.5. Conclusiones	367

3.6. EFECTO DEL DIÁMETRO DE LAS ESTAQUILLAS DURAS SOBRE LA BROTACIÓN Y EL PRENDIMIENTO.....	369
3.6.1. Introducción	369
3.6.2. Objetivos	369
3.6.3. Material y métodos	369
3.6.4. Resultados y discusión	370
3.6.5. Conclusiones	372
3.7. INFLUENCIA DEL GRADO DE LIGNIFICACIÓN DE LAS ESTAQUILLAS SOBRE EL PRENDIMIENTO.....	373
3.7.1. Introducción	373
3.7.2. Objetivos	373
3.7.3. Material y métodos	374
3.7.4. Resultados y discusión	377
3.7.5. Conclusiones	380
3.8. EFECTO DE LA APLICACIÓN DE ÁCIDO INDOLBUTÍRICO (AIB) SOBRE EL ENRAIZAMIENTO Y POSTERIOR PRENDIMIENTO DE LAS ESTAQUILLAS	381
3.8.1. Introducción	381
3.8.2. Objetivos	384
3.8.3. Material y métodos	385
3.8.4. Resultados y discusión	386
3.8.5. Conclusiones	391
3.9. EFECTO DE LA DURACIÓN DEL TRATAMIENTO TÉRMICO A BAJAS TEMPERATURAS PREVIAS A LA PLANTACIÓN DE LAS ESTAQUILLAS DURAS..	393
3.9.1. Introducción	393
3.9.2. Objetivos	394
3.9.3. Material y métodos	395
3.9.4. Resultados y discusión	396
3.9.5. Conclusiones	404
3.10. INFLUENCIA DEL SELLADO DE LOS EXTREMOS DE LAS ESTAQUILLAS PARA REDUCIR SU DESHIDRATACIÓN	405
3.10.1. Introducción	405
3.10.2. Objetivos	405
3.10.3. Material y métodos	405
3.10.4. Resultados y discusión	407
3.10.5. Conclusiones	413
3.11. EFECTO DEL LESIONADO DE LA BASE DE LAS ESTAQUILLAS SOBRE EL PRENDIMIENTO.....	415
3.11.1. Introducción	415

3.11.2. Objetivos	416
3.11.3. Material y métodos	416
3.11.4. Resultados y discusión	418
3.11.5. Conclusiones	424
4. CONCLUSIONES GENERALES	425
5. BIBLIOGRAFIA	433

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.7.1. Evolución de la superficie (ha) y producción (t) de alcaparras en España en el periodo 1985-2014	81
Figura 1.7.2. Evolución del valor (€ x 10 ³) de las alcaparras en España en el periodo 1985-2014.	86
Figura 2.1.1. Modelo trifásico de absorción de agua de las semillas durante el proceso de germinación.	93
Figura 2.1.2. Árbol filogenético de semillas basado en la morfología interna del embrión y del endospermo, en semillas maduras de angiospermas, con indicación (junto al nombre de la familia) la clase de latencia que presentan sus semillas	113
Figura 2.1.3. Disminución de la viabilidad y el vigor con el tiempo de un lote de semillas típico.	120
Figura 2.1.4. Ilustración de isotermas de sorción.	125
Figura 2.4.1. Modelo logístico ajustado de germinación acumulada de las semillas de las subespecies <i>rupestris</i> y <i>spinosa</i> , con y sin adición de AG ₃ al sustrato.	159
Figura 2.5.2.1. Evolución de la humedad (%) de las semillas, intactas y troceadas, durante el remojo.	166
Figura 2.5.3.1. Evolución de la Imbibición de 10 semillas de manera individualizada (líneas finas) y valor medio de las mismas (línea gruesa). Experimento 1, realizado con semillas de 2010.	169
Figura 2.5.3.2. Evolución de la Imbibición de 10 semillas de manera individualizada (líneas finas) y valor medio de las mismas (línea gruesa). Experimento 2, realizado con semillas de 2014.	170
Figura 2.5.4.1. Evolución de la imbibición de agua (%) por parte de las semillas, propias y del lote comercial, en remojo.	178

Figura 2.5.4.2. Evolución de la humedad (%) de las semillas, propias y del lote comercial, en remojo.	180
Figura 2.5.4.3. Evolución de la imbibición de agua (%) por parte de las semillas, obtenida con semillas a remojo en columnas de agua de 100 y 10 mm, y humedecidas con el método BP.	181
Figura 2.5.4.4. Evolución de la humedad (%) de las semillas, obtenida con semillas a remojo en columnas de agua de 100 y 10 mm, y humedecidas con el método BP.	182
Figura 2.5.5.1. Evolución de la imbibición de agua por parte de las semillas (%), intactas y escarificadas, manualmente o con bisturí, en remojo. ...	185
Figura 2.5.5.2. Evolución de la humedad (%) de las semillas en remojo, según el tipo de escarificación (intactas, escarificación manual o con bisturí) realizado a las semillas.	187
Figura 2.5.6.1. Evolución de la humedad (%) de las semillas intactas, de la cubierta y del endospermo, con el periodo de remojo de las mismas. ...	192
Figura 2.5.6.2. Análisis de la interacción “Partes de la semilla x Período de remojo” de la tabla 3.3	194
Figura 2.6.2.1. Evolución de la viabilidad y de la germinación de las semillas de los dos lotes analizados (2008 y 2009), obtenidas en los respectivos test al tetrazolio y de germinación.....	201
Figura 2.6.2.2. Funciones “Pérdida de viabilidad” ($PV = 100 - V$) y “Pérdida de poder germinativo” ($PG = 100 - G$) correspondientes a los valores medios de los dos experimentos.....	203
Figura 2.6.2.3. Evolución del porcentaje de germinación de las semillas, con las ordenadas expresadas en escala <i>probit</i>	204
Figura 2.6.2.4. Evolución de la viabilidad y de la germinación de las semillas de los dos lotes analizados (2008 y 2009), obtenidas en los respectivos test al tetrazolio y de germinación, considerando únicamente los cuatro primeros años de almacenamiento.....	206

Figura 2.6.2.5. Modelo logístico ajustado de los test de germinación realizados en cada lote de semillas y cada año de edad	207
Figura 2.6.3.1. Modelo logístico ajustado a la germinación acumulada correspondiente a los valores medios de los cuatro períodos transcurridos entre la recolección y el inicio del ensayo de germinación.	215
Figura 2.7.2.1. Modelo logístico ajustado a la germinación acumulada correspondiente a los valores medios para las diferentes dosis de irradiación láser (0, 10, 30, 60 y 120 s; a) y la adición de AG ₃ al sustrato (b).	228
Figura 2.7.3.1. Estructura molecular de la celulosa y zonas de acción de las endoglucanasas, celobiohidrolasas y β -glucosidasas.	240
Figura 2.7.3.2. Estructura química de la hemicelulosa y zonas de acción de las enzimas hidrolíticas que intervienen en su degradación.	241
Figura 2.7.3.3. Estructura química de la lignina con unidades de guaiacyl (G) y syringyl (S).	242
Figura 2.7.3.4. Mecanismo de acción del complejo enzimático Cellulase from <i>Trichoderma reesei</i>	243
Figura 2.7.3.5. Mecanismo de acción del complejo Driselasa a través de la enzima xilanasa (Sigma-Aldrich, 2017).	243
Figura 2.7.3.6. Mecanismo de acción del complejo Driselasa a través de las enzimas celulasa y laminaranasa.	244
Figura 2.7.3.7. Mecanismo de acción de Driselasa por enzimas endoglucanasas, celobiosidasas y β -glucosidasas.	244
Figura 2.7.3.8. Escala de colores opuestos. Coordenadas Hunter L, a, b. .	248
Figura 2.7.3.9. Modelo logístico ajustado a la germinación acumulada correspondiente a los valores medios de los complejos enzimáticos, del experimento 1, Driselasa y <i>Trichoderma reesei</i>	250
Figura 2.7.3.10. Modelo logístico ajustado a la germinación acumulada correspondiente a los valores medios de los tiempos de aplicación de los complejos enzimáticos, del experimento 1	251

Figura 2.7.3.11. Modelo logístico ajustado a la germinación acumulada correspondiente a los valores medios de la adición de AG ₃ al sustrato, del experimento 1.....	251
Figura 2.7.3.12. Modelo logístico ajustado a la germinación acumulada correspondiente a los valores medios de la interacción “Complejo enzimático x Tiempo de incubación”, del experimento 1.....	255
Figura 2.7.3.13. Modelo logístico ajustado a la germinación acumulada correspondiente a los valores medios de la interacción “Complejo enzimático x Adición de AG ₃ al sustrato”, del experimento 1.....	255
Figura 2.7.3.14. Modelo logístico ajustado a la germinación acumulada correspondiente a los valores medios de la interacción “Tiempo de incubación x Adición de AG ₃ al sustrato”, del experimento 1.....	256
Figura 2.7.3.15. Modelo logístico ajustado a la germinación acumulada correspondiente a los valores medios de las concentraciones del complejo enzimático <i>Trichoderma reesei</i> , del experimento 2.....	263
Figura 2.7.3.16. Modelo logístico ajustado a la germinación acumulada correspondiente a los valores medios de los tiempos de incubación con el complejo enzimático <i>Trichoderma reesei</i> , del experimento 2.....	263
Figura 2.7.3.17. Modelo logístico ajustado a la germinación acumulada correspondiente a los valores medios de la adición de ácido giberélico (AG ₃), del experimento 2.....	264
Figura 2.7.3.18. Modelo logístico ajustado a la germinación acumulada correspondiente a los valores medios de la interacción “Concentración complejo enzimático x Tiempo de incubación”, del experimento 2.....	266
Figura 2.7.3.19. Modelo logístico ajustado a la germinación acumulada correspondiente a los valores medios de la interacción “Complejo enzimático x Adición de AG ₃ al sustrato”, del experimento 2.....	267
Figura 2.7.3.20. Modelo logístico ajustado a la germinación acumulada correspondiente a los valores medios de la interacción “Tiempo de incubación x Adición de AG ₃ al sustrato”, del experimento 2.....	268

Figura 2.7.3.21. Contenido de sólidos solubles totales de la solución del complejo <i>Trichoderma reesei</i> al finalizar la incubación para cada una de las concentraciones de complejo ensayadas (0, 6.25, 12.5, 18.75 y 25%).	274
Figura 2.7.3.22. Valor de Croma de las distintas soluciones del complejo <i>Trichoderma reesei</i> al finalizar la incubación para cada una de las concentraciones de complejo ensayadas (0, 6.25, 12.5, 18.75 y 25%). .	274
Figura 2.8.2.1. Representación gráfica del efecto de la interacción “Periodo de estratificación x Remojo previo”, en la germinación acumulada de la tabla 2.8.2.3.	286
Figura 2.8.2.2. Representación gráfica de la interacción “Periodo de estratificación x Adición de AG ₃ ” de la tabla 2.8.2.3.	287
Figura 2.8.2.3. Representación gráfica de la interacción “Remojo previo x Adición de AG ₃ ”, de la tabla 2.8.2.3.	288
Figura 2.8.2.4. Evolución del contenido en giberelinas activas (GAs= GA1 + GA4), ácido abscísico (ABA) y citoquininas (CKs: isopenteniladenina + dihidrozeatina + trans-zeatina) durante la estratificación refrigerada de las semillas.	289
Figura 2.8.3.1. Representación gráfica de la interacción “Periodo de estratificación x Adición de AG ₃ al sustrato”, de la tabla 2.8.3.2.	294
Figura 3.4.1. <i>Capparis spinosa</i> subsp. <i>spinosa</i> : Tallos con flores y frutos, semillas, estípula	341
Figura 3.4.2. <i>Capparis spinosa</i> subsp. <i>rupestris</i> : Tallos con flores y frutos, semillas, estípulas.	342
Figura 3.4.3. Prendimiento de las estaquillas de <i>C. spinosa</i> de la subsp. <i>rupestris</i> (srV y srI) y <i>spinosa</i> (ss).	347
Figura 3.4.4. Evolución de la brotación en estaquillas de <i>C. spinosa</i> de las subsp. <i>rupestris</i> (srV y srI) y <i>spinosa</i> (ss).	347
Figura 3.4.5. Evolución de la aparición de los brotes por estaquillas de <i>C. spinosa</i> de las subsp. <i>rupestris</i> (srV y srI) y <i>spinosa</i> (ss).	349

Figura 3.4.6. Longitud de los brotes en estaquillas de <i>C. spinosa</i> de las subsp. <i>rupestris</i> (srV y srI) y <i>spinosa</i> (ss).	349
Figura 3.4.7. Posición de los brotes en la estaquilla (nudo) de <i>C. spinosa</i> de la subsp. <i>rupestris</i> (srV y srI) y <i>spinosa</i> (ss).	350
Figura 3.5.1. Evolución de la brotación de las estaquillas duras (%) en función de su posición dentro de la rama. (A y B) Material vegetal procedente de la Isla de Ibiza. (C, D y E) Material vegetal procedente de Valencia.	361
Figura 3.5.2. Evolución de la brotación y enraizamiento (%) de estaquillas semiduras en función de su posición dentro de la rama	365
Figura 3.5.3. Evolución de los brotes de las estaquillas duras (%) en función de su posición dentro de la estaquilla.	366
Figura 3.6.1. Evolución del prendimiento de las estaquillas duras (%) en función de su diámetro.	371
Figura 3.6.2. Longitud total (cm) de los brotes en función del diámetro (mm) de las estaquillas duras en el momento de la plantación.	372
Figura 3.7.1. Prendimiento de las estaquillas suaves en función de su diámetro (A) y longitud (B).	378
Figura 3.7.2. Prendimiento de las estaquillas basales semiduras en función de su diámetro. (A) plantación realizada en el mes de julio y (B) plantación realizada en el mes de noviembre.	379
Figura 3.7.3. Prendimiento de las estaquillas apicales semiduras en función de su diámetro.	380
Figura 3.8.1. Efecto de la utilización de AIB en el prendimiento de las estaquillas suaves, en función de su diámetro.	388
Figura 3.8.2. Efecto de la aplicación de AIB en el prendimiento de las estaquillas semiduras apicales en función de su diámetro.	389
Figura 3.8.3. Efecto de la aplicación de AIB en el prendimiento de las estaquillas semiduras basales en función de su diámetro.	390

Figura 3.8.4. Efecto de la aplicación de AIB en el prendimiento de las estaquillas duras basales en función de su diámetro.	391
Figura 3.9.1. Prendimiento de las estaquillas en función del tiempo de permanencia a 4°C antes de su plantación.	397
Figura 3.9.2. Evolución de la brotación en estaquillas sometidas a distintas temperaturas antes de su plantación. (A) 4°C y 22°C durante 7 d. (B) 4°C durante 24 y 48 h.	397
Figura 3.9.3. Evolución de la brotación de las estaquillas en función del tiempo de permanencia a 4°C antes de su plantación.	399
Figura 3.9.4. Evolución de la aparición de los brotes por planta y la longitud total de los brotes.	400
Figura 3.9.5. Evolución de la aparición de los brotes en las estaquillas en función del tiempo de permanencias a 4°C antes de su plantación [Un día (A) y 16 días (B)].	401
Figura 3.9.6. Longitud de los brotes en estaquillas sometidas a distintos periodos de frío 4°C antes de su plantación.	402
Figura 3.9.7. Posición de los brotes en la estaquilla (nudo) en función del periodo de tiempo que se han sometido a bajas temperaturas. Comparación del control con un día (A) y 16 días (B).	403
Figura 3.9.8. Porcentaje de brotes en función de su posición en la estaquilla (nudo) y el periodo de la aplicación de bajas temperaturas (4°C).	404
Figura 3.10.1. Prendimiento de las estaquillas en función del sellado. Estaquillado: 14 enero (A) y estaquillado 8: marzo (B).	409
Figura 3.10.2. Evolución de la brotación en estaquillas en función del sellado. Estaquillado: 14 enero (A) y estaquillado: 8 marzo (B).	410
Figura 3.10.3. Evolución de la aparición de los brotes por estaquilla en función del sellado. Estaquillado: 8 de marzo.	411
Figura 3.10.4. Longitud de los brotes en estaquillas en función del sellado. Estaquillado: 8 de marzo.	411

Figura 3.10.5. Posición de los brotes en la estaquilla (nudo) en función del sellado. Estaquillado: 8 de marzo.....	412
Figura 3.11.1. Prendimiento de las estaquillas en función del tipo de lesión. Estaquillado: 8 de marzo.	421
Figura 3.11.2. Evolución de la brotación en las estaquillas en función del tipo de lesión. Estaquillado: 8 de marzo.....	422
Figura 3.11.3. Evolución de la aparición de los brotes por estaquilla (A). Longitud de los brotes según el tipo de lesión (B). Estaquillado: 8 de marzo.	423
Figura 3.11.4. Posición de los brotes en la estaquilla (nudo) en función del tipo de la lesión. Estaquillado: 8 de marzo.....	424

ÍNDICE DE FOTOGRAFÍAS

- Fotografía 1.1.1 Cubiertas de la edición de 1644 en griego y latín de Historia Plantarum, de Teophrastus Eresii y de *Naturalis historiae, Tomus primus*, de Plinii Secundi. Edición de 1669, Hackios, Rotterdam, Países Bajos..... 6
- Fotografía 1.1.2. Portada de una edición antigua del Talmud de Babilonia...7
- Fotografía 1.1.3. Manuscritos del Mar Muerto (a) y cuevas cercanas a las ruinas de Qumrán, en las que fueron encontrados los citados manuscritos (b), conocidos también como Rollos de Qumrán.....8
- Fotografía 1.1.4. Cubierta de *De Materia medica* (Acerca de la materia medicinal, y de los venenos mortíferos), de Dioscórides. Edición de 1555, Juan Latio, Anvers, Bélgica. Página en la que se presenta la planta de *Capparis*. 9
- Fotografía 1.1.5. Cubiertas de *Arte coquinaria*, de Apicio (Marcus Gavius Apicius). Edición de 1709, y de *Les dovze livres de Lucivs Iunius Moderatus Columella des chofes Rufticques*. Edición 1552. Iacques Keruer Libraire iuré, París, Francia..... 10
- Fotografía 1.1.6. Cubiertas de *Regimen Sanitatis (cum expositione magistri Arnaldi de Villanova cathellano noviter impressus)*. Primera edición, 1480, y de *De Honesta Voluptate et Valetudine. Libri decem*, de Bartolomeo Platina. Ed. 1537..... 12
- Fotografía 1.1.7. Cubierta de *De Plantis Epitome utilifsima*, de Mattioli. Ed. 1586 y página en la que se presenta la planta de *Capparis*. 13
- Fotografía 1.1.8. Cubiertas de *Le theatre d'agriculture et mesnage des champs*, de Olivier de Serres. Ed. 1608, y de *La singolare dottina*, de Domenico Romoli. Edición de 1587..... 13
- Fotografía 1.2.1. Arbusto de *C. spinosa* L. en plena floración con sus tallos rastreros. 18

Fotografía 1.2.2. Nudo de <i>C. spinosa</i> subsp. <i>rupestris</i> al que se ha eliminado la hoja para dejar al descubierto las dos espinas estipulares, una a cada lado de la yema.....	19
Fotografía 1.2.3. Flores de <i>C. spinosa</i> L. subsp. <i>rupestris</i> . Se aprecian sus pétalos blancos, los estambres con sus filamentos violáceos y el ovario sostenido sobre un largo ginóforo.	21
Fotografía 1.2.4. Fruto de <i>C. spinosa</i> L. subsp. <i>rupestris</i> antes de su madurez.	22
Fotografía 1.2.5 Semillas de <i>C. spinosa</i> L. subsp. <i>rupestris</i>	23
Fotografía 1.3.1. Alcaparras creciendo entre las rocas.	28
Fotografía 1.3.2. Alcaparras creciendo entre las grietas de las paredes de piedra.	29
Fotografía 1.3.3. Alcaparras suspendidas entre las piedras del “Muro de la Lamentaciones” en Jerusalén.	30
Fotografía 1.3.4. Alcaparras suspendidas entre las piedras del Coliseo de Roma	30
Fotografía 1.3.5. Alcaparras suspendidas entre las piedras de las murallas de Pisa (Italia).	31
Fotografía 1.3.6. Alcaparras suspendidas entre las piedras de las murallas de Milan.	31
Fotografía 1.3.7. Alcaparras suspendidas entre las piedras del monasterio de Santa María de la Valldigna (Simat de la Valldigna; València).	32
Fotografía 1.3.8. Alcaparras suspendidas entre las piedras de las murallas de Gandía (València).....	32
Fotografía 1.3.9. Alcaparras suspendidas entre las piedras de las murallas de Palma de Mallorca (Illes Balears).	33
Fotografía 1.3.10. Alcaparras suspendidas entre las piedras las murallas de Ibiza (Illes Balears).	34

Fotografía 1.4.1. Envase de semillas comerciales (a) y semillas recolectadas en la parcela de la UPV (b).	40
Fotografía 1.4.2. Plantaciones regulares de alcaparras en un campo de Campos (a) y otro de LLubí (b) en Mallorca.	46
Fotografía 1.4.3. Campos de secano donde se cultivan cereales, almendro y alcaparras. Las alcaparras empiezan a expandirse sobre la superficie del suelo una vez a finalizada la siega del cereal.	47
Fotografía 1.4.4. Recolección tradicional de la alcaparra.....	54
Fotografía 1.5.1. Fotografía de la primera limpieza y clasificación de alcaparras (Mallorca).....	59
Fotografía 1.5.2. Fotografía de las botas de madera que se utilizaban hace unas décadas en Mallorca para el curado de las alcaparras.....	60
Fotografía 1.6.1. Tarros comerciales de alcaparras y alcaparrones encurtidos.	70
Fotografía 1.6.2. Manada de ovejas y cabras pastando en un campo de cereales. Las alcaparras se desarrollan sin ser comidas a pesar de su llamativo color verde.....	71
Fotografía 1.6.3. Flor de alcaparra mostrando la amplia gama cromática de sus órganos.	72
Fotografía 1.6.4. Escultura que representado los botones florales de la alcaparra en Campos (Mallorca). Diseño del joyero Damia Mulet.....	73
Fotografía 1.6.5. Algunas de las joyas, en oro y plata, de la colección <i>Capparis spinosa</i> realizadas por el joyero Damià Mulet en Campos (Mallorca).....	74
Fotografía 2.1.1. Final de la primera fase de la germinación de las semillas de <i>C. spinosa</i> : rotura de la cubierta.	94
Fotografía 2.1.2. Segunda fase de la germinación de las semillas de <i>C. spinosa</i> : emergencia de la radícula y crecimiento del hipocótilo.....	95

Fotografía 2.2.1. Planta de alcaparra (a) y localización (b) de la parcela de procedencia del material vegetal utilizado.	137
Fotografía 2.2.2. Clave utilizada en el ensayo al tetrazolio de las semillas de <i>C. spinosa</i> para discriminar entre las cuatro categorías de indemnidad del tejido: a) sano; b) débil, pero viable; c) débil, no viable; d) muerto.	140
Fotografía 2.2.3. Disposición de las semillas comerciales en placa Petri para el ensayo de germinación (a). Disposición de las placas Petri de diferentes tratamientos en la cámara de cultivo (b).	141
Fotografía 2.3.1. Lupa Leica modelo MZ APO (a). Microscopio electrónico de barrido JEOL modelo JSM6300 (b).	146
Fotografía 2.3.2. Vista lateral (a) y frontal (b) de la antera. Detalle de una sección de la misma tras la antesis (c).	147
Fotografía 2.3.3. Sección longitudinal del ovario (a). Detalle del ovario, en la que se observa el exocarpio, el mesocarpio, y varios óvulos unidos a la placenta (b). Detalle de un óvulo, con su funículo, estilo y el estigma capitado (c).	148
Fotografía 2.3.4. Sección transversal del fruto (a). Fruto inmediatamente después de la dehiscencia (b). Detalle de las semillas recubiertas del endocarpio (c).	148
Fotografía 2.3.5. Endocarpio envolviendo totalmente a la semilla (a), y dos semillas, una con, y la otra sin endocarpio (b).	149
Fotografía 2.3.6. Semilla reniforme (a). Detalle del hilo (b). Detalle del hilo y del micrópilo (c).	149
Fotografía 2.3.7. Sección longitudinal de una semilla, en la que se puede observar el endospermo (a) y el embrión (b), con sus cotiledones enrollados.	150
Fotografía 2.3.8. Detalles de la cubierta de las semillas (a y b). En b, T: testa, Ext: exotegmen, Mt: mesotegmen, Ent: endotegmen y End: endospermo	151
Fotografía 2.3.9. Epidermis externa (a) y detalle de un estoma (b).....	151

Fotografía 2.3.10. Cubierta de la semilla, compuesta de testa y tegmen. ..	152
Fotografía 2.3.11. Embrión rodeado por el endospermo (a). Detalle del embrión (b). Detalle de los cotiledones (c).	152
Fotografía 2.3.12. Semilla teñida con colorante sudán.	153
Fotografía 2.4.1. Planta de <i>C. spinosa</i> subsp. <i>rupestris</i> (a) y detalle de la parte apical de una rama en plena producción (b).	155
Fotografía 2.4.2. Planta de <i>C. spinosa</i> subsp. <i>spinosa</i> (a) y detalle de la parte apical de una rama en plena producción (b).	156
Fotografía 2.4.3. Frutos de las subespecies <i>rupestris</i> y <i>spinosa</i> de <i>C. spinosa</i> , enteros (a) y sección de los mismos (b). Los frutos de la subsp. <i>rupestris</i> (<i>spinosa</i>) son los situados a la izquierda (derecha) en la fotografía a y en la parte superior (inferior) de la fotografía b.	156
Fotografía 2.5.3.1. Evolución diaria de la tinción con azul de metileno. Semilla antes de la imbibición (a); tras el remojo durante el número de días indicado: 1 (b); 2 (c); 3 (d); 4 (e); 5 (f); 6 (g); 7 (h); 8 (i).	173
Fotografía 2.5.4.1. Evolución de la posición de las semillas en remojo con el paso del tiempo.	177
Fotografía 2.5.6.1. Separación de las semillas en la cubierta y el endospermo.	190
Fotografía 2.5.6.2. Semilla intacta (a); Cubierta de la semilla (b); endospermo (c).	190
Fotografía 2.6.1. Lixiviación de solutos y presencia de hongos durante el ensayo de germinación.	220
Fotografía 2.6.2. Lixiviación del mucílago producido en determinados ensayos de germinación.	220
Fotografía 2.7.2.1. Láser He-Ne, 1145 JDSU.	225
Fotografía 2.7.2.2. Elongación de radícula e hipocótilo de las plántulas de las semillas germinadas.	226

Fotografía 2.7.3.1. Complejo enzimático Cellulase from <i>Trichoderma reesei</i> ATCC 26921 y Driselase® from Basidiomicetes D9515 utilizados...	246
Fotografía 2.7.3.2. Germinación de la semilla de <i>C. spinosa</i> . Detalle de la rotura de la cubierta (a) y de la emergencia de la radícula (b).	259
Fotografía 3.1.1. Vista de una plantación de estaquillas de alcaparra antes de su brotación.	308
Fotografía 3.1.2. Plantas de <i>Capparis spinosa</i> subsp. <i>rupestris</i> propagadas in vitro.	312
Fotografía 3.1.3. Estaquilla nodal brotada de <i>Capparis spinosa</i> subsp. <i>rupestris</i> en cultivo in vitro (a), y sin brotar en la que se observan las bases del peciolo y el pedúnculo floral (b).	313
Fotografía 3.2.1. Vista aérea de los lugares de obtención del material vegetal. Aledaños de las murallas de Ibiza (A) y parcela situada en la UPV (B).	315
Fotografía 3.2.2. Vista de las plantas madre de <i>Capparis spinosa</i> subsp. <i>spinosa</i> (A) y <i>Capparis spinosa</i> subsp. <i>rupestris</i> (B) de la parcela de la UPV.	316
Fotografía 3.2.3. Vista de las plantas madre silvestres de <i>Capparis spinosa</i> subsp. <i>rupestris</i> en las murallas de Ibiza (A) y en sus aledaños (B).	317
Fotografía 3.2.4. Vista general de las bancadas del invernadero.	319
Fotografía 3.2.5. Detalle de un contenedor perforado en la parte inferior (a). Contenedor relleno de sustrato y correctamente rotulado (b). Bandejas de alveolos con los recipientes en su interior (c).	321
Fotografía 3.2.6. Planta de <i>C. spinosa</i> sbps. <i>rupestris</i> en la que han brotado las yemas de los nudos situados por debajo de la superficie del sustrato.	322
Fotografía 3.2.7. Planta de <i>C. spinosa</i> sbps. <i>rupestris</i> en el momento de evaluar la longitud de sus brotes con ayuda de una regla graduada.	322
Fotografía 3.3.1. Corte histológico de sección transversal de una raíz de <i>C. spinosa</i> L. subsp. <i>rupestris</i> (a) y sección longitudinal de la base de una	

estaquilla de <i>C. spinosa</i> subsp. <i>rupestris</i> mostrando un corte longitudinal de raíz adventicia (r) y un primordio de raíz (pr). Epidermis (e). Cortex (c). Cambium (cb). Floema (f). Xilema (x).....	328
Fotografía 3.3.2. Corte histológico de sección transversal (a) y longitudinal (b) de una estaquilla de <i>C. spinosa</i> L. subsp. <i>rupestris</i> mostrando el corte longitudinal de un trozo de raíz (r).....	328
Fotografía 3.3.3. Raíces recién formadas en una estaquilla de <i>Capparis spinosa</i> subsp. <i>rupestris</i>	329
Fotografía 3.3.4. Las raíces salen desde el callo y de un nudo de la estaquilla de <i>Capparis spinosa</i> subsp. <i>rupestris</i>	330
Fotografía 3.3.5. Cortes histológicos de la sección transversal de un tallo de plántula procedente de semilla de <i>C. spinosa</i> subsp. <i>rupestris</i> . Sección transversal de un tallo (a). Detalle de una sección transversal de un tallo (b). Médula (m). Anillo vascular (av). Tráqueas (t). Epidermis (e). Cámbium (cb).....	332
Fotografía 3.3.6. Cortes histológicos de estaquillas de <i>C. spinosa</i> subsp. <i>rupestris</i> . Sección transversal de una estaquilla de tallo lignificado (a). Detalle de una sección transversal de una estaquilla de tallo lignificado (b). Médula (m). Anillo vascular (av). Tráqueas (t). Peridermis (p). Cámbium (cb).....	332
Fotografía 3.3.7. Corte de estaquilla suave de <i>C. spinosa</i> subsp. <i>rupestris</i> transversal (a) y longitudinal (b). En ambos casos se aprecia un sistema vascular muy desarrollado. Las dos espinas, situadas a ambos lados de la yema, tienen una consistencia herbácea y mas o menos recta (a).	333
Fotografía 3.3.8. Corte histológico de sección longitudinal de un nudo de una estaquilla de <i>C. spinosa</i> L. subsp. <i>rupestris</i> mostrando la inserción del peciolo y de una yema axilar (a). Detalle de una yema (b). En ambas fotografías se observa la presencia de una sola yema por nudo. Meristemo apical (ma). Primordios foliares (pf). Prófilos (p). Peciolo (pe). Yema (Y). Espina estipular (ee). Tallo (T).	334
Fotografía 3.3.9. Yema axial de una estaquilla de <i>C. spinosa</i> L. subsp. <i>rupestris</i>	334

Fotografía 3.3.10. Cortes histológicos del limbo de hojas de <i>C. spinosa</i> sbps. <i>rupestris</i> . Sección del limbo de la hoja (a). Sección transversal del nervio principal de la hoja (b). Parenquima en empalizada (pe). Parenquima lagunar (pl). Epidermis del Haz (eh). Epidermis del envés (ee). Haz vascular (hv).	335
Fotografía 3.3.11. Cortes histológicos del peciolo de una hoja de <i>C. spinosa</i> sbps. <i>rupestris</i> (a). Detalle del corte del peciolo (b).	336
Fotografía 3.3.12. Cortes histológicos de secciones longitudinales de nudos de estaquillas de <i>C. spinosa</i> L. subsp. <i>rupestris</i> mostrando la inserción del peciolo y del pedúnculo de la flor en posición axial. En ambas fotografías se observa la ausencia de yemas, una vez que ha brotado la única yema.	337
Fotografía 3.4.1. Planta de <i>Capparis spinosa</i> subsp. <i>spinosa</i> en un campo de Llubí (Mallorca).	344
Fotografía 3.4.2. Estaquillas de la subsp. <i>rupestris</i> listas para la plantación.	344
Fotografía 3.5.1. Vista del diseño experimental.	355
Fotografía 3.5.2. Estaquillas de <i>Capparis spinosa</i> brotadas.	356
Fotografía 3.5.3. Cilindro metálica cuadrículado empleado para la estimación del grado de enraizamiento (a). Detalle del grado de enraizamiento de las estaquillas (b).....	357
Fotografía 3.5.4. Parte terminal de brotes en los que se observan todas las yemas brotado en forma de flor solitaria (a), excepto una de ellas, que lo ha hecho en forma de brote mixto (b).	359
Fotografía 3.5.5. Estaquilla semidura de <i>Capparis spinosa</i> subsp. <i>rupestris</i> procedente del centro de la rama. Se aprecian gran cantidad de raíces, sin embargo, la estaquilla no puede brotar porque ha consumido todas sus yemas.....	363
Fotografía 3.5.6. Planta de alcaparra. En la que se observa el primer nudo por debajo de la superficie del sustrato y el primero por encima de la superficie del suelo brotados.	365

Fotografía 3.7.1. Aspecto de la plantación de estaquillas de madera suave.	374
Fotografía 3.7.2. Aspecto de la plantación de estaquillas de madera semidura.	375
Fotografía 3.7.3. Aspecto de las estaquillas de madera dura (A). Aspecto de la plantación de madera dura (B).	376
Fotografía 3.8.1. Estaquilla de <i>Capparis spinosa</i> subsp. <i>rupestris</i> mostrando una intensidad de raíces baja (a) y alta (b).	
Fotografía 3.10.1. Estaquilla sellada en el extremo superior (A). Estaquilla sellada en los dos extremos (B).	407
Fotografía 3.11.1. Estaquillas con cortes en la corteza (A). Eliminación de sección de la corteza (B).	417

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1.4.1. Sistema de clasificación de alcaparras.....	56
Tabla 1.4.2. Sistema de clasificación de alcaparrones	56
Tabla 1.6.1. Información nutricional de 100 g de alcaparras.....	65
Tabla 2.1.1. Sistema de clasificación de latencia de las semillas propuesto por Baskin y Baskin (1998). No incluye a las semillas con embriones indiferenciados.	106
Tabla 2.1.2. Características de la latencia de las semillas con latencia fisiológica. Obtenida de Baskin y Baskin (2004) a partir del esquema de Baskin y Baskin (1998).	107
Tabla 2.1.3. Niveles de latencia morfofisiológica (LMFg), temperatura, o secuencia de temperaturas, requeridas para su interrupción y para el crecimiento del embrión, y respuesta a la adición de AG ₃	108
Tabla 2.1.4. Clave dicotómica para diferencias los tipos de latencia/no latencia morfológica, morfofisiológica, física, física + fisiológica (combinada); y las dos subclases (epicotilo y regular) de la latencia fisiológica. Para ello se utilizarán semillas maduradas de manera natural, incubadas a temperaturas adecuadas para su germinación (Baskin y Baskin, 2014).....	109
Tabla 2.4.1. Efecto de la subespecie (subsp. <i>rupestris</i> y subsp. <i>spinosa</i>) y de la adición de AG ₃ al sustrato, en el porcentaje de la germinación acumulada (G, %), la germinación máxima (A, %), y los parámetros de germinación t_{50} (d) y $k/2$ (d ⁻¹), de las semillas de la especie <i>C. spinosa</i> .	160
Tabla 2.4.2. Análisis de las interacciones de los análisis de la varianza de la tabla 2.4.1. Efecto de la subespecie (subsp. <i>rupestris</i> y subsp. <i>spinosa</i>) y de la adición de AG ₃ al sustrato, en el porcentaje de la germinación acumulada (G, %), la germinación máxima (A, %), y los parámetros de germinación t_{50} (d) y $k/2$ (d ⁻¹), de las semillas de la especie <i>C. spinosa</i> .	161

Tabla 2.5.2.1. Efecto del troceado de las semillas, tras el remojo de las mismas durante 96 o 192 horas, en el valor determinado de la humedad (%) de las semillas.....	167
Tabla 2.5.4.1. Efecto del lote de las semillas en la imbibición (%) y humedad (%) de las mismas, tras su remojo durante 96 o 192 horas.....	179
Tabla 2.5.4.2. Efecto del método de humedecimiento de las semillas en la imbibición (%) y humedad (%) de las mismas, tras su remojo durante 96 o 192 horas.	183
Tabla 2.5.5.1. Efecto del tipo de escarificación realizada a las semillas en la imbibición (%) y en la humedad (%) de las mismas, tras su remojo durante 96 o 192 horas.	186
Tabla 2.5.6.1. Efecto del período de remojo (h) en la humedad (%) de las semillas, intactas y de sus partes, cubierta y endospermo.....	193
Tabla 2.5.6.2. Evolución de la humedad (%) de la semilla y de la pérdida de peso fresco de la misma al separar la cubierta del endospermo, para distintos períodos de remojo. Valor medio de las 4 repeticiones.....	194
Tabla 2.6.2.1. Influencia del lote de la semilla (año de producción) y de la edad de las semillas (años de almacenamiento) en la viabilidad (V, %), el porcentaje de germinación acumulada (G, %), germinación final (A, %), t_{50} (d) y $k/2$ (d^{-1}).....	209
Tabla 2.6.2.2. Efecto de la interacción de la tabla 2.6.2.1: “Lote de semillas (año de producción) x Edad de las semillas (años de almacenamiento)” en la viabilidad (V, %), el porcentaje de germinación acumulada (G, %), germinación final (A, %), t_{50} (d) y $k/2$ (d^{-1}).....	210
Tabla 2.6.3.1. Fechas de recolección y número de días transcurridos desde la recolección hasta el inicio del ensayo de germinación (DDR), para cada período de recolección.....	213
Tabla 2.6.3.2. Influencia del lote de semillas (año de su producción; L) y del período (número de días) días transcurrido desde la recolección hasta el inicio del ensayo de germinación (DDR) en la germinación acumulada (G, %), el máximo porcentaje de germinación (A, %), el número de días	

necesarios para alcanzar el 50% de la germinación final ($t_{50} = \beta/k$, d), y la velocidad media relativa de germinación acumulada ($k/2$, d^{-1}).....	216
Tabla 2.6.3.3. Análisis del efecto de la interacción de la tabla 2.6.3.2: “lote de semillas (año de su producción; L) x período (número de días) días transcurrido desde la recolección hasta el inicio del ensayo de germinación (DDR)” en la germinación acumulada (G, %), el máximo porcentaje de germinación (A, %), el número de días necesarios para alcanzar el 50% de la germinación final ($t_{50} = \beta/k$, d), y la velocidad media relativa de germinación acumulada ($k/2$, d^{-1}).....	217
Tabla 2.7.2.1. Influencia de las diferentes dosis de irradiación láser (Duración de la Irradiación, DI; s) y de la adición de AG_3 al sustrato, en la germinación acumulada (G, %), el porcentaje máximo de germinación (A, %), el número de días necesarios para alcanzar el 50% de la germinación final (t_{50}) (β/k , d) y la velocidad media relativa de germinación acumulada ($k/2$, d^{-1}).....	229
Tabla 2.7.2.2. Influencia de las diferentes dosis de irradiación láser y de la adición de AG_3 al sustrato, en el porcentaje de plántulas elongadas, la longitud media de las plántulas (raíz + hipocótilo) y la longitud de la plántula (raíz + hipocótilo) de mayor tamaño.....	234
Tabla 2.7.3.1. Efecto del complejo enzimático (CE), del tiempo de la incubación enzimática (T; h) y de la adición de AG_3 al sustrato (AG_3), en la germinación acumulada (G, %), máximo porcentaje de germinación (A, %), número de días necesarios para alcanzar el 50% de la germinación final ($t_{50} = \beta/k$, días) y velocidad media relativa de germinación acumulada ($k/2$, d^{-1}), del experimento 1.....	253
Tabla 2.7.3.2. Análisis de las interacciones significativas de los análisis de la varianza de la tabla 2.7.3.1, complejo enzimático (CE), tiempo de la escarificación (T; h), adición de AG_3 al sustrato (AG_3), en la germinación acumulada (G; %), máximo porcentaje de germinación (A), número de días necesarios para alcanzar el 50% de la germinación final t_{50} (d) y velocidad media relativa de germinación acumulada ($k/2$) del experimento 1.....	254

Tabla 2.7.3.3. Efecto del complejo enzimático (CE), del tiempo de la incubación enzimática (T; h) en el porcentaje de germinación de las semillas (G), en la viabilidad de las semillas no germinadas tras el ensayo de germinación (sng), y la viabilidad total de las semillas tras la incubación (semillas germinadas +semillas viables), en el experimento 1. Valores medios.	260
Tabla 2.7.3.4. Efecto de la concentración del complejo enzimático de <i>Trichoderma reesei</i> (C, %), del tiempo de incubación (T, horas) y de la adición de AG ₃ al sustrato (AG ₃), en la germinación acumulada (G, %), máximo porcentaje de germinación (A, %), número de días necesarios para alcanzar el 50% de la germinación final ($t_{50} = \beta/k$, días) y velocidad media relativa de germinación acumulada ($k/2$, d ⁻¹), del experimento 2.	265
Tabla 2.7.3.5. Análisis de las interacciones significativas de los análisis de la varianza de la tabla 2.7.3.4. Concentración del complejo enzimático de <i>Trichoderma reesei</i> (C, %), tiempo de la incubación (T, h), adición de AG ₃ al sustrato (AG ₃), germinación acumulada (G; %), máximo porcentaje de germinación (A; %), número de días necesarios para alcanzar el 50% de la germinación final (t_{50} ; β/k , d) y velocidad media relativa de germinación acumulada ($k/2$; d ⁻¹) del experimento 2.	269
Tabla 2.7.3.6. Efecto del tiempo de la incubación enzimática (T) y de la concentración del complejo enzimático (<i>Trichoderma reesei</i>) en el porcentaje de germinación de las semillas (G), en la viabilidad de las semillas no germinadas tras el ensayo de germinación (sng), y la viabilidad total de las semillas tras la incubación (semillas germinadas +semillas viables), en el experimento 2. Valores medios.	271
Tabla 2.7.3.7. Efecto de la concentración del complejo enzimático <i>Trichoderma reesei</i> y del tiempo de incubación en el contenido en celulosa, hemicelulosa y lignina de las semillas, tras la incubación.	272
Tabla 2.7.3.8. Efecto de la concentración del complejo enzimático <i>Trichoderma reesei</i> y del tiempo de incubación en el contenido en sólidos solubles totales (SST), coordenadas Hunter a, b, L, y valor de Cromo, correspondientes a cada solución del complejo enzimático al finalizar incubación.	273

Tabla 2.8.2.1. Viabilidad de las semillas después de la estratificación refrigerada y del remojo previo, expresada en porcentaje de semillas con tejidos tipo: (A) tejidos sanos, (B) tejidos débiles y viables, (C) tejidos teñidos no viables y (D) tejidos no teñidos, muertos.	282
Tabla 2.8.2.2. Influencia de la estratificación, el remojo previo y la adición de AG ₃ al sustrato en el ensayo de germinación, en la germinación acumulada (G), máximo porcentaje de germinación (A), número de días necesarios para alcanzar el 50 % de la germinación final (t ₅₀) y velocidad media relativa de germinación acumulada (k/2).....	284
Tabla 2.8.2.3. Análisis de las interacciones significativas de los análisis de la varianza de la tabla 2.8.2.2. en la germinación acumulada (G), máximo porcentaje de germinación (A), número de días necesarios para alcanzar el 50 % de la germinación final (t ₅₀) y velocidad media relativa de germinación acumulada (k/2). PE: Periodo de estratificación (d). RP: Remojo previo (h). AG ₃ : Adición de AG ₃ al sustrato.	285
Tabla 2.8.3.1. Viabilidad de las semillas obtenida en el ensayo al tetrazolio realizado después del periodo de estratificación cálida, expresada en porcentaje de semillas con:(A) tejidos sanos, (B) tejidos débiles y viables, (C) tejidos teñidos no viables y (D) tejidos no teñidos, muertos.	292
Tabla 2.8.3.2. Influencia de la estratificación cálida y la adición de AG ₃ al sustrato, en la germinación acumulada (G), máximo porcentaje de germinación (A), número de días necesarios para alcanzar el 50 % de la germinación final (t ₅₀) y velocidad media relativa de germinación acumulada (k/2).	293
Tabla 2.8.3.3. Efecto de la interacción significativa “Periodo de estratificación x Adición de AG ₃ al sustrato”, de la tabla 2.8.3.2, en la germinación acumulada (G), máximo porcentaje de germinación (A), número de días necesarios para alcanzar el 50% de la germinación final (t ₅₀), y velocidad media relativa de germinación acumulada (k/2).	294
Tabla 3.7.1. Influencia de la lignificación de las estaquillas sobre el prendimiento (estaquillas enraizadas y brotadas a la vez).	3378
Tabla 3.8.1. Efecto de la utilización de AIB en el prendimiento de las estaquillas.	387

1. INTRODUCCIÓN GENERAL

La alcaparra (*Capparis spinosa* L.) es un arbusto conocido en todo el mundo, originario de las regiones áridas de Asia central u occidental, que fue introducido en las islas del Mar Egeo por los griegos y posteriormente se expandió por los países mediterráneos, donde crece de forma espontánea al encontrarse en condiciones óptimas de suelo y clima. La importancia económica de la alcaparra condujo a un aumento significativo tanto de la superficie de cultivo como de la producción durante los años ochenta del siglo XX. Esta especie ha desarrollado mecanismos especiales para sobrevivir en condiciones mediterráneas, y su introducción en terrenos semiáridos puede ayudar a prevenir la ruptura del equilibrio de esos frágiles ecosistemas. La capacidad de adaptación del género *Capparis* ha sido, sin duda, una respuesta frente a las adversidades de la naturaleza creando diversidad con su amplitud fitoquímica y con la robustez de la planta.

A pesar de la creciente demanda mundial de alcaparras y de su importancia socioeconómica, los estudios dedicados a esta especie han sido escasos hasta tiempos recientes y, dado el uso potencial de esta especie como una alternativa para las tierras marginales, puede afirmarse que la alcaparra se merece más trabajos de investigación y, sobre todo, una mayor difusión de los mismos.

1.1. EVOLUCIÓN HISTÓRICA DE *CAPPARIS* SPP.

El uso de las alcaparras (botones florales) y los alcaparrones (frutos) tiene una larga historia en la alimentación humana. En efecto, los frutos del género *Capparis* ya se consumían hace 18000 - 17000 años (Lansky *et al.*, 2014), como lo demuestra un fragmento delgado de piel de alcaparrón encontrado en unas excavaciones arqueológicas del Paleolítico en Wadi Kubbaniya, al oeste del Valle del Nilo (Alto Egipto) (Hillman, 1989).

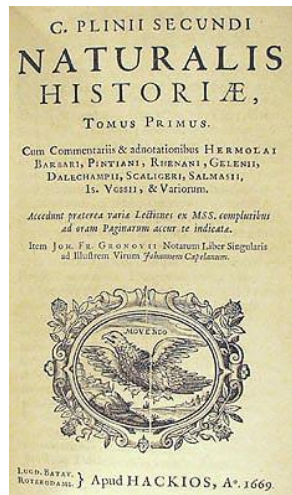
En el actual estado de Israel se han encontrado restos vegetales, utilizados por cazadores-recolectores preagrícolas, datados entre 15000 y 10000 años (Maroto, 2014). En Tell es-Sawwan (Iraq) se encontraron gran cantidad de semillas de alcaparra datadas en 5800 a. C. (Helback, citado por Sozzi, 2001; Lansky *et al.*, 2014). En las tumbas de Yaghai (China) se han descubierto semillas de *C. spinosa* L. datadas en 2800 a. C., estando ahora depositadas en el Turpan Museum, en Xinjiang (China) (Jiang *et al.*, 2007). La primera referencia escrita conocida sobre alcaparras se encuentra en una leyenda sumeria de 3000 - 2000 a. C. (Lansky *et al.*, 2014). En la antigua Grecia, entre otros usos, las alcaparras se utilizaban como condimento.

El origen etimológico del nombre *Capparis* proviene del griego “kappariz”, acuñado por Teofrasto (siglo IV a. C.) y respaldado por Dioscórides (siglo I). Este término, a su vez, fue ampliamente utilizado por la cultura árabe en la Edad Media (Sozzi, 2001).

Las primeras referencias escritas sobre las propiedades medicinales de los diferentes tejidos de las plantas de alcaparras son obra de Hipócrates. En su época ya eran conocidas las propiedades medicinales de las alcaparras como tratamiento para la neumonía (Enfermedades III, 7, 142,7), pleuresía (enfermedades III, 7, 150, 11) y fístulas (VI, 460, 3,6) (Sozzi, 2001).

Las alcaparras también se usaron en cosmética por Phryne (siglo IV a. C.) para ayudar a mantenerse joven y para mantener la piel libre de arrugas y con un color sano (Castro y Nosti, citado por Sozzi, 2001; Lansky *et al.*, 2014). Las

alcaparras utilizadas provenían, generalmente de plantas silvestres. Las dificultades en la propagación en tierras cultivadas ya fueron sugeridas por Theophrasto (371 – 287 a. C.; Eresii, T.; *Libri de historia et de causis pantarum* III, 1, 4, Fotografía 1.1.1). Los antiguos hebreos suponían que la baya de la alcaparra tenía propiedades afrodisiacas según relata un poema de la Biblia hebrea (Eclesiastés 12, 5), que hace referencia a la ancianidad, probablemente escrito en el siglo III a. C.: “También se tiene miedo de las alturas y los sobresaltos en el camino, la almendra es desdeñada, la langosta se hace pesada y estalla la alcaparra, pues marcha el hombre hacia la casa de su eternidad y los plañideros recorren las calles”, que en el contexto actual sería equivalente a “Acuérdate de él antes de que tengas miedo de caerte y te preocupes de los peligros de la calle; antes de que el cabello se te ponga blanco como un almendro en flor y arrastres los pies sin energía como un saltamontes moribundo, y la alcaparra ya no estimule el deseo sexual. Acuérdate de él antes de que te falte poco para llegar a la tumba -tu hogar eterno- donde los que lamentan tu muerte llorarán en tu entierro”.



Fotografía 1.1.1 Cubiertas de la edición de 1644 en griego y latín de Historia Plantarum, de Teophrastus Eresii y de Naturalis historiae, Tomus primus, de Plinii Secundi. Edición de 1669, Hackios, Rotterdam, Paises Bajos.

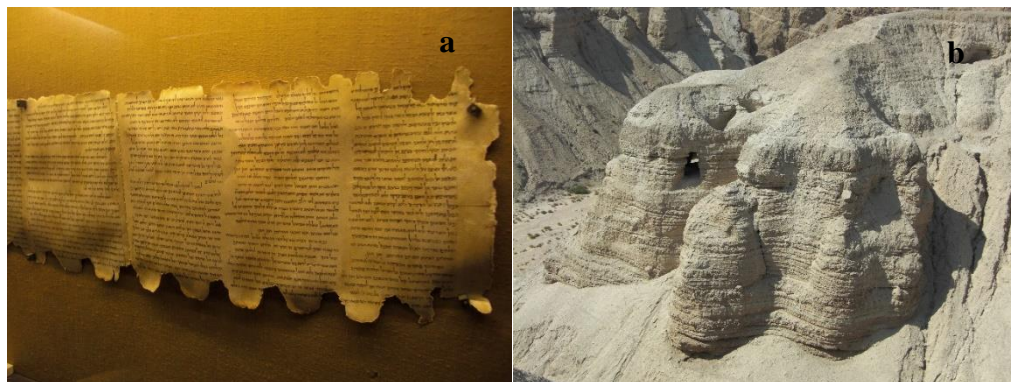
En el Talmud de Babilonia (Fotografía 1.1.2) aparece citada varias veces la alcaparra (El Talmud; Sh'lita, 2004), tanto sus bayas (*nitzpé*) como sus botones florales. En el Talmud se relata un incidente relacionado con la alcaparra: “En cierta ocasión Ravina encontró a Mar bar Rav Ashi arrojando las bayas de alcaparra y comiendo las cáscaras (botones florales)”. En el Talmud se indica que el consumo de la baya de la alcaparra no estaba permitido, pero sí el del botón floral, porque no éste era considerado “protector del fruto”, ya que al eliminar la cáscara (sépalos) de una baya de alcaparra, la baya sobrevivió, lo que no ocurrió al sacar el “*netz*” de una granada, ya que ésta se secó.



Fotografía 1.1.2 Portada de una edición antigua del Talmud de Babilonia.

El Levítico Rabbah (34:16) y los Manuscritos del Mar Muerto (Jassen, 2014) (Fotografía 1.1.3) hacen referencia al crecimiento exuberante

de la planta al citar una leyenda de un hombre piadoso que al visitar su viñedo descubrió una brecha en la pared, y aunque inicialmente pensó en arreglarla, no lo hizo por ser sábado; Dios lo recompensó plantando allí una alcaparra, que cubrió toda la brecha y además le permitió ganarse la vida con sus productos.



Fotografía 1.1.3 Manuscritos del Mar Muerto (a) y cuevas cercanas a las ruinas de Qumrán, en las que fueron encontrados los citados manuscritos (b), conocidos también como Rollos de Qumrán.

Plinio el Viejo, en su *Naturalis historia* (Fotografía 1.1.1), publicada posteriormente por su sobrino Plinio el Joven (Plinii Secundi), afirmó que los arbustos de alcaparras deben ser sembrados en localidades secas y suelos arenosos. Además, puso de manifiesto el carácter invasor de este tipo de plantas al escribir "... la parcela está hueca y rodeada con un terraplén de piedras erigidas a su alrededor: si no se toma esta precaución, se extenderá por toda la tierra adyacente" (XIX, 48, 2). Por otra parte, Dioscórides (Pedacio Dioscórides, c.40 – c.90) indicó las propiedades terapéuticas de las alcaparras en su obra *De Materia Medica* (II, 249; Fotografía 1.1.4).



Fotografía 1.1.4. Cubierta de De *Materia medica* (Acerca de la materia medicinal, y de los venenos mortíferos), de Dioscórides. Edición de 1555, Juan Latio, Anvers, Bélgica. Página en la que se presenta la planta de *Capparis*.

En *De re coquinaria* (IV, 1; obra atribuida a Marco Gavio Apicio, que vivió en el siglo I, pero realmente parece ser una obra del siglo IV o V; Fotografía 1.1.5), las alcaparras fueron clasificadas como condimento; el poeta Marcial (Marcus Valerius Martialis, 40 - 104), amigo de Plinio el Joven, las mencionó en uno de sus famosos *Epigrammatus* (III, 77). Claudius Galenus citó la alcaparra entre plantas medicinales; Columela (Lucius Junius Moderatus Columela, 4 – 70) dio una descripción de este arbusto perenne en su tratado agrícola *De Re Rustica* (XI, 3; Fotografía 1.1.5) compuesto hacia el año 42: “La alcaparra en la mayor parte de las provincias nace espontáneamente en los barbechos; pero si se hubiere de sembrar en los países donde no la hay, necesitará un sitio seco; y éste se deberá rodear antes con una zanjilla que se llenará de piedras y cal, o de mezcla a la cartaginesa para que sirva de parapeto, por decirlo así, impenetrable a los tallos de dicha mata que se extienden por casi todo el terreno, si no se les estorba con algún dique: lo cual sin embargo no es tan incómodo (pues se pueden arrancar de cuando en cuando) como perjudicial,

pues tiene una ponzoña perniciosa, y con su jugo esterilizan el terreno. Ningún cultivo exige, o se contenta con uno muy ligero, como que se mantiene fuerte aun en los campos desiertos sin trabajo del labrador: se siembra en ambos equinoccios”.



Fotografía 1.1.5. Cubiertas de *Arte coquinaria*, de Apicio (Marcus Gavius Apicius). Edición de 1709, y de *Les douze livres de Lucius Iunius Moderatus Columella des chofes Rusticques*. Edición 1552. Iacques Keruer Libraire iuré, París, Francia.

Plutarco (Lucius Mestrius Plutarchus, c.46 o 50 – c. 120) en su obra *Moralia* (traducida como “Obras morales y de costumbres”), en el libro VIII *Quaestiones convivales* (Charlas de sobremesa), relata que las alcaparras encurtidas se usaban solas para recuperar el apetito (VI, 2, 687d), o como ingrediente de una comida deliciosa (IV, 4, 668a-b). Ateneo de Náucratis (Athenaios Naukratita) mencionó las alcaparras varias veces en su libro de cocina *Deipnosophistae* (El banquete de los eruditos). Otros autores que las citaron en sus obras son: Asitophon (II, 63a), Nicostratus (IV, 133c), Alexis (IV, 170a), Timocles (XIII, 567e) y Antiphanes (II, 68a, IV, 161e) (Lansky *et al.*, 2014). En un asentamiento romano de Mons Claudianus (Siglos I-II,

Van der Veen, 1999) y en el puerto romano de Berenik (siglos I-IV) se han encontrado restos de alcaparras (Lansky *et al.*, 2014).

Regimen Sanitatis Salernitanum es un tratado redactado en los siglos XII y XIII, con carácter didáctico, en versos latinos, en el entorno de la Escuela de Salerno (Fotografía 1.1.6); en la primera edición impresa en castellano, publicada en 1480 con comentarios de Arnau de Vilanova, contenía 364 versos, entre los que se citaba a la alcaparra como planta medicinal:

L

De diversis remediis

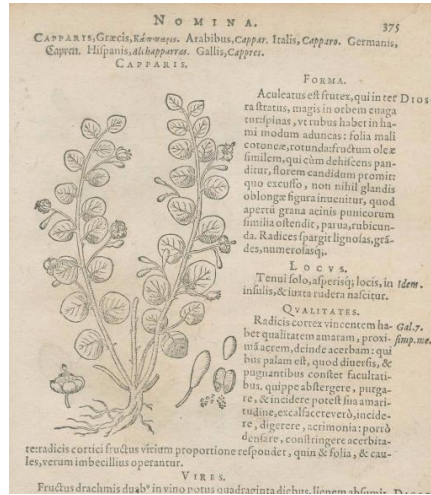
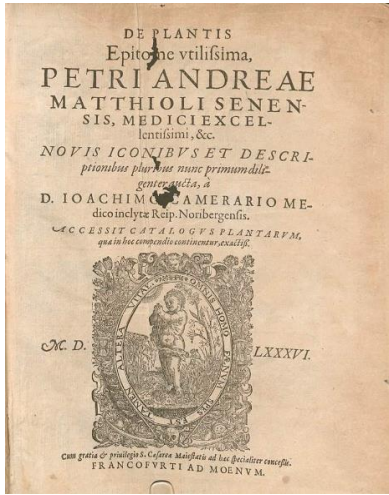
*Si cruor emanat, spodium sumptum cito sanat.
gaudet hepar spodio, mace cor cerebrum quoque moscho,
pulmo liquirite, splen capparitis stomachumque galanga.*

Bartolomeo Platina (en realidad Bartolomeo Sacchi, 1451-1481), humanista, escritor y gastrónomo, escribió *De Honesta Voluptate et Valetudine* (Fotografía 1.1.6), en el que incluyó a la alcaparra (Decem, Libri III, praeter prefatio; 14) y agregó nuevos consejos médicos. Mattioli (Pietro Andrea Gregorio Mattioli, 1501-1577) describió la alcaparra y sus cualidades (*De Plantis Epitome utilifsima*; Fotografía 1.1.7) y señaló algunas propiedades terapéuticas de las alcaparras. El cirujano Ambroise Paré (1510-1590), considerado el padre de la cirugía moderna, recomendaba utilizar la alcaparra, entre otras plantas, para detener hemorragias en las fracturas de huesos. El francés Olivier de Serres (1539-1619), considerado padre de la agronomía francesa, relató diferentes métodos de preparación de las alcaparras en su *Théâtre d'Agriculture* (XI; Fotografía 1.1.8).

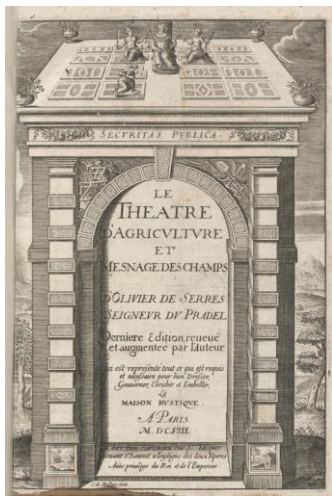


Fotografía 1.1.6. Cubiertas de *Regimen Sanitatis (cum expositione magistri Arnaldi de Villanova cathellano noviter impressus)*. Primera edición, 1480, y de *De Honesta Voluptate et Valetudine. Libri decem*, de Bartolomeo Platina. Ed. 1537.

En el siglo XVI, el médico y naturalista Pierre Belon (1516-1564), encontró unos arbustos espinosos (alcaparras) que eran diferentes de otros tipos europeos que crecían en las regiones de Alejandría, Suez y Sinaí (Darby *et al.*, 1977). Domenico Romoli publicó en 1560 en Venezia *La singolare dottrina* (Fotografía 1.1.8), en la que daba curiosos consejos en favor de ciertos alimentos afrodisíacos, entre los que figura la alcaparra: “*la senape (mostaza)... accende la lussuria, i porri... commuovono il coito, i capperi... lo fan vivace*”.



Fotografía 1.1.7. Cubierta de *De Plantis Epitome utilissima*, de Mattioli. Ed 1586 y página en la que se presenta la planta de *Capparis*.



Fotografía 1.1.8. Cubiertas de *Le theatre d'agriculture et mesnage des champs*, de Olivier de Serres. Ed. 1608, y de *La singolare dottina*, de Domenico Romoli. Edición de 1587.

En Inglaterra, algunos documentos revelan el consumo de alcaparras durante el siglo XVII (Sozzi, 2001; Lansky *et al.*, 2014). En 1657, Coles distinguió cinco clases de plantas de alcaparras sin diferencias morfológicas clara, e indicó los lugares y las estaciones en que crecieron (Lansky *et al.*, 2014).

Según Luna y Pérez (1985), los primeros indicios de la existencia de la alcaparra en España se remontan a la primera mitad del siglo I, habiendo sido citado por Columela, como se ha indicado anteriormente. A principios del siglo XIX, el poeta español Gaspar Melchor de Jovellanos mencionó la alcaparra en su descripción del castillo de Bellver, Palma de Mallorca (Font Quer, 1962), donde crece en las murallas. A finales del siglo XIX, las alcaparras francesas que se habían cultivado durante los siglos XVIII y XIX, fueron reemplazadas por el producto español e italiano (Lansky *et al.*, 2014).

La alcaparra fue un cultivo importante en Provençe durante los siglos XVIII y XIX, pero a finales del siglo XIX, las alcaparras francesas fueron reemplazadas por las producidas en España e Italia (Sozzi, 2001).

1.2. BOTÁNICA

1.2.1. Taxonomía y distribución

Los árabes la llamaron *alkabara*, palabra que en castellano se transformó en *alcaparra*. El género *Capparis* se debe a Linnaeus (1753, 1754), que describió a *Capparis spinosa* L. entre otras especies de *Capparis* (Jarvis *et al.*, 1993; Inocencio *et al.*, 2006). El género *Capparis* es el género más grande de la familia *Capparaceae*, incluye más de 350 especies, aparentemente muy distintas, distribuidas en las regiones tropicales y subtropicales de todos los continentes (Costa y Rossi, 2005). La especie *spinosa* es la más conocida mundialmente del género *Capparis* debido a su relevancia nutricional y económica. De todas las especies del Género *Capparis*, tan solo unas pocas tienen interés económico [9 según Uphof (1968), 15 según otros autores (Cornejo e Iltis, 2012; Bond, 1990)].

En España, *C. spinosa* es conocida en lengua castellana por varios nombres, *alcaparra*, *alcaparro*, *tapanera*, *tapenera*, *tápena*, *tápáno*, *alcaparrera*, o *caparro*; *tàpera* en catalán; *câprier* en francés; *cappero* en italiano; *kapernstrauch* o *kapper* en alemán; *alcaparreira* en portugués; *adveeyonah* en hebreo; *kapari* o *kebere* en turco; *dàmá* en chino (Alkire, 1998; Villar y Melo, 2009); *kapris* en finlandés; *kiari* en hindi; *kapricserje* en húngaro; *torkav* en estonio; *kapers* en Islandés y en noruego; *lussef* en egipcio; *kappara* en maltés; *kapersy* en ruso, *aimsra* en sánscrito y *kapris* en sueco (Rahnavard y Razavi, 2016).

El sistema de clasificación APG III está basado en un cladograma o árbol filogenético de las angiospermas, y ordena las familias de angiospermas en clados y órdenes. Según este sistema, la *alcaparra* se encuadra de la siguiente manera:

Clado Angiospermae
 Clado Eudicotiledoneae
 Clado Gunneridae
 Clado Rosidae
 Clado Malvidae
 Orden Brassicales
 Familia Capparaceae
 Género Capparis
 Especie spinosa

La familia Capparaceae, comprende unos 45 géneros y 930 especies de árboles, arbustos y plantas herbáceas. Crece a lo largo de las carreteras, en las laderas, áreas rocosas y pedregosas y generalmente se adapta bien a las áreas secas (Rahnavard y Razavi, 2016). Las especies de esta familia se distribuyen en las zonas de baja altitud de los trópicos y subtropicos en ambos hemisferios, así como en los climas templados de la cuenca mediterránea. Las especies silvestres de *Capparis* se encuentran en países de la cuenca mediterránea, desde el Sáhara en África del Norte, a las regiones secas de Asia Occidental y Central. Sin embargo, en Europa se han encontrado los géneros *Cleome* y *Capparis* (Heywood, 1964; 1985; Sozzi, 2001).

Capparis es un género grande y puede afirmarse que sólo parcialmente estudiado en tiempos recientes. La disparidad en cuando al número de especies reconocidas según diversos autores, demuestra que este género ha sido taxonómicamente descuidado (Jacobs, 1965; Luna y Pérez, 1985; Bond, 1990; Barbera *et al.*, 1991; Judd *et al.*, 1994; 1999). La identificación de las especies en este género, en el que existe una elevada variabilidad, es muy difícil y hay diferentes opiniones en cuanto al rango asignado a los diferentes taxones y a su subordinación (Zohary 1960, Jacobs, 1965; Higton y Akeroyd, 1991). Los cruzamientos intraespecíficos son relativamente comunes y esto hace que los límites entre las distintas especies no siempre sean claros. En base a esto, *C. spinosa* puede considerarse un complejo de especies (Rao y Das, 1978), debido a que el

flujo continuo de genes a lo largo de su evolución ha dificultado su identificación (Jiménez, 1987). Las clasificaciones, en base a variaciones morfológicas han llevado al reconocimiento de variedades, con resultados, en ocasiones, insatisfactorios (Rao y Das, 1978; Sozzi, 2001).

Las caparáceas o caparidáceas están muy relacionadas con la familia *Brassicaceae* (antes *Cruciferae*) al compartir caracteres comunes (Rodman 1991a, b, Zomlefer, 1994). Basándose en análisis cladístico moleculares (Rodman *et al.*, 1993) y morfológicos (Judd *et al.*, 1994; Sozzi, 2001), se ha propuesto que las caparidáceas formen un complejo parafilético dentro de *Brassicaceae* (Zomlefer, 1994, Judd *et al.*, 1999).

Algunos de los taxones incluidos en *C. spinosa* por Jacobs (1965) han sido considerados como especies independientes por otros autores (Zohary, 1969, Bokhari y Hedge, 1975, Rao y Das, 1978). Higton y Akeroyd (1991) reconocieron tres taxones en Europa, principalmente basadas en caracteres vegetativos: (1) *C. spinosa* subsp. *rupestris* (Sibth. & Sm.) Nyman, extendido por las rocas costeras y acantilados de la cuenca mediterránea; (2) *C. spinosa* subsp. *spinosa* var. *spinosa* que, se encuentra predominantemente en España, Francia e Italia; (3) *C. spinosa* subsp. *spinosa* var. *canescens* Cosson, difundida en el sur de Europa y Anatolia. Los dos primeros están estrechamente relacionados con el material vegetal cultivado en España, mientras que el tercero parece que podría ser la variante nativa de la planta cultivada. Sin embargo, Fici y Gianguzzi (1997) sugirieron que *C. spinosa* subsp. *spinosa* var. *spinosa* y var. *canescens* podrían representar dos variantes edáficas de la misma entidad. Tanto *C. spinosa* subsp. *spinosa* var. *canescens* y *C. spinosa* subsp. *rupestris*, están presentes en la isla de Pantelleria. La primera está muy extendida en los regosoles, los litosoles y las rocas sedimentarias como la arcilla y la marga; la segunda está presente a lo largo de los terrenos calizos de la costa y los acantilados volcánicos (Sozzi, 2001).

1.2.2. Morfología y anatomía

La alcaparra (Fotografía 1.2.1) es una dicotiledónea perenne, espinosa en algunas especies y caducifolia, subarborescente o leñosa. La planta puede llegar a alcanzar unos cuarenta o cincuenta centímetros de altura cuando crece en las zonas secas y áridas. En su parte aérea está ramificada desde la base formando tallos de desarrollo rastrero glabrescentes o, sobre todo los jóvenes, con pelos simples a estrellados. Los tallos que son rastreros se renuevan todos los años y pueden alcanzar hasta 3 metros de longitud, y lo hacen a partir de las yemas existentes en la base de la rama, desde los muñones de la cepa hasta aproximadamente 25 cm. (Oliver, 1868; Wild, 1960; Zahory, 1966; Jafri, 1977; Luna y Pérez, 1985; Fici et al., 1993; Talavera y Castroviejo, 1999; Melgarejo, 2000; Sozzi, 2001; Maroto, 2002; Pennington *et al.*, 2004; Zhang and Tucker, 2008; Lansky *et al.*, 2014). La alcaparra se calcula que tiene una vida útil entre 30 y 40 años, aunque en algunos casos puede alcanzar los 80 años.



Fotografía 1.2.1. Arbusto de *C. spinosa* L. en plena floración con sus tallos rastreros.

Las hojas presentan filotaxia helicoidal $2/5$, de 2 a 5 centímetros de longitud, glabras o pubescentes, simples, enteras o subenteras. Su forma es redondeada o acorazonada, más o menos ovalada, con su base redondeada y un ápice mucronado, obtuso. La hoja es peciolada, con peciolo de 3 a 10 mm de longitud, de la base del cual parten dos apéndices, de hasta un centímetro de longitud, transformados en espinas estipulares de color amarillento pálido a rojizo (Fotografía 1.2.2), más o menos curvadas y divaricadas, pero a veces débilmente desarrolladas, de consistencia leñosa en algunas subespecies (Reche, 1967; Luna y Perez, 1985) que dificultan la recolección manual de los botone florales. Esta suele llevarse a cabo antes del amanecer o a primera hora de la mañana para anticiparse al endurecimiento de dichas espinas a medida que el sol las calienta. Las hojas son de color verde, de consistencia coriácea, crasa, poco gruesas y anfiestomáticas (Psaras *et al.*, 1996). Las hojas poseen estomas en ambos lados, distribuidos uniformemente, que se mantienen abiertos continuamente durante el día en el período de crecimiento.



Fotografía 1.2.2. Nudo de *C. spinosa* subsp. *rupestris* al que se ha eliminado la hoja para dejar al descubierto las dos espinas estipulares, una a cada lado de la yema.

Las plantas de alcaparra presentan flores muy vistosas, hermafroditas, solitarias, de 4 a 7 cm de diámetro que nacen en las axilas de las hojas (Fotografía 1.2.3). El principal aprovechamiento de este cultivo son sus botones florales, de forma ovalada y de hasta 14 mm de diámetro, que cuando están cerrados conforman las alcaparras. La floración es exclusivamente nocturna y en algunas especies estas flores presentan una vida media muy corta, del orden de un día. Las brácteas, presentes en su mayoría, desaparecen temprano. El cáliz, casi simétrico o zigomórfico, está formado por cuatro sépalos de color verdoso o purpúreo, libres o unidos en la base, valvados o imbricados; el sépalo posterior frecuentemente es más grande y más cóncavo que los demás. La corola posee cuatro pétalos blancos que en algunas ocasiones adquieren tonalidades rosa-pálido, imbricados, delicados, aovados, generalmente caducos después de la antesis, los dos posteriores coherentes, formando una protuberancia o cavidad carnosa nectarífera con la base ancha. La flor presenta numerosos estambres (de 50 a 250), con los filamentos alargados que sobrepasan ligeramente a los pétalos, con diferentes longitudes, glabros, insertados en el disco en la base del ginóforo y de un color que varía del blanco al violeta desde la base a la antera, de color violáceo. El ovario esta sostenido por el ginóforo, una prolongación del eje floral o pedúnculo de consistencia robusta, tan largo como los estambres, apenas se alarga con la presencia del fruto, pero a menudo se vuelven más gruesos. El ovario es glabro, cilíndrico o elipsoide, generalmente unilocular con 2-8 (< 10) placentas y multitud de óvulos. El estigma sésil o subsésil.



Fotografía 1.2.3. Flores de *C. spinosa* L. subsp. *rupestris*. Se aprecian sus pétalos blancos, los estambres con sus filamentos violáceos y el ovario sostenido sobre un largo ginóforo.

El arbusto de alcaparra es conocido por ser noctiflora (Jacobs 1965). Florece durante aproximadamente 16 h al día, concretamente desde 18:00 hasta 10:00 de la mañana siguiente (Petanidou *et al.*, 1996). Las flores de *Capparis* atraen a diferentes insectos, la mayoría de los cuales tienen baja eficiencia de polinización, salvo las abejas (Eisikowitch *et al.*, 1986; Dafni y Shmida, 1996). La mayor parte de la secreción de néctar en *C. spinosa* es nocturna. La concentración de aminoácidos, así como la concentración de hexosa, aumentan con la edad de las flores, mientras que la concentración de sacarosa disminuye (Eisikowitch *et al.*, 1986; Petanidou *et al.*, 1996; Sozzi, 2001).

El fruto, denominado alcaparrón o caparrón (Fotografía 1.2.4), también es comestible en su estado inmaduro; es una baya ovalada, más estrecha por la parte de la inserción que por la parte superior, de 3 a 5 cm de longitud y de largo pedúnculo. Usualmente con pericarpio coriáceo, liso, verruculoso o acanalado y, a menudo, con un color verdoso cuando no está

en su madurez, que va virando hacia rojo mientras va alcanzándola; carnoso en su interior (Mallor *et al.*, 2012), dehiscentes en la madurez botánica.



Fotografía 1.2.4. Fruto de *C. spinosa* L. subsp. *rupestris* antes de su madurez.

Numerosas semillas por fruto, reniformes (Fotografía 1.2.5), incrustadas en la pulpa. Tienen unas dimensiones de unos 2-4 mm de longitud y de 2-3.5 mm de diámetro. Al alcanzar la madurez adquieren una tonalidad que va del rojizo al marrón oscuro. La cubierta, formada por testa y tegmen, tiene un espesor de 0,2 a 0,3 mm, es dura y muy poco permeable al agua, destacando la presencia del hilo. La germinación es epigea. El peso de mil semillas oscila entre 6 y 8 gramos.

Las semillas rodeadas de pulpa dulce son comidas y transportadas por las aves y otros animales que se sienten atraídos por el aroma y color del fruto maduro, y actúan como agentes dispersantes (Li Vigni y Melati, 1999).



Fotografía 1.2.5. Semillas de *C. spinosa* L. subsp. *rupestris*.

Una vez la planta está bien establecida, la raíz es ramificada, gruesa, fuerte, fibrosa y resistente, lo que le permite adaptarse a climas áridos. La gran profundidad que pueden alcanzar las raíces le confieren la aptitud para extraer la humedad del suelo y adaptarse sin problemas a ambientes pobres, lo que le permite fijar el suelo (Reche, 1967). La presencia de micorrizas en sus raíces sirve para maximizar la captación de minerales de suelos pobres. En la rizosfera de las alcaparras se han aislado diferentes capas bacterianas fijadoras de nitrógeno, desempeñando un papel en el mantenimiento de altas reservas de este elemento limitante del crecimiento. La corona de la planta forma un tocón, que llega a alcanzar un grosor de 20 – 25 cm en algunas

plantas. En algunos casos se ha observado que estas raíces pueden alcanzar hasta diez metros de profundidad, lo que facilita el aprovechamiento de toda la humedad que puede haber en el suelo, adaptándose a climas áridos (Reche, 1967; González, 1973; Luna y Pérez, 1985; Melgarejo, 2000; Sozzi, 2001).

1.3. ECOFISIOLOGIA

En la cuenca mediterránea, la alcaparra crece tanto en el medio silvestre como en cultivo.

En muchas zonas de tierras marginales del territorio español, en los años sesenta y setenta del siglo pasado, existían rodales de plantas silvestres de alcaparras con características morfológicas muy heterogéneas, resultado de su reproducción por semillas.

Aparte de las condiciones ambientales, el éxito en el cultivo de la alcaparra depende principalmente de la obtención de ecotipos de alta calidad y producción, de tener una propagación adecuada, un control adecuado de las prácticas de cultivo, en particular la recolección, un procesado y almacenamiento adecuados después de la cosecha, y de la existencia de sistemas y estrategias de mercadeo eficientes.

1.3.1. Requisitos medioambientales

La alcaparra es una planta xerófila, al ser una especie originaria de zonas desérticas o semidesérticas, que vegeta en climas áridos y semiáridos, extremadamente resistente a la sequía (Maroto, 2002) y se desarrolla bien en condiciones de altas temperaturas, baja humedad ambiental y fuertes vientos. No obstante, el clima más propicio para el cultivo de las alcaparras es el semiárido, templado y suave. En las zonas en las que se cultiva, se registran unas temperaturas medias anuales $> 14^{\circ}\text{C}$ y las lluvias anuales varían de 200 mm en España, a 500 mm en Pantelleria (Italia) y 700 mm en Salina (Italia) (Rahnavard y Razavi, 2016). Se considera que lo ideal es la presencia de lluvia primaveral y calor estival (Barbera *et al.*, 1991). En estas condiciones de secano la alcaparra no necesita riego, ya que puede soportar períodos prolongados de estrés hídrico, pero sí que se aconseja el riego en las zonas de secano que presentan alta luminosidad y temperatura, y baja

humedad relativa en el ambiente durante el período de crecimiento vegetativo de la planta.

La planta puede soportar períodos prolongados de estrés hídrico, por lo que es recomendable en las zonas de secano que presentan alta luminosidad y temperatura, y baja humedad relativa en el ambiente durante el período de crecimiento vegetativo de la planta. Tolera la falta de humedad, ya que las raíces cuentan con un elevado contenido en agua en sus tejidos que la planta puede utilizar en casos de sequía, aunque agradece una cierta humedad en el suelo durante el otoño-invierno para poder acumularla y almacenarla. Sin embargo, en verano es sensible al exceso de humedad, ya que con la ella aparecen infecciones fúngicas.

Las condiciones ambientales como la temperatura y la humedad influyen en la calidad de las alcaparras tanto de forma directa, como indirecta condicionando la recolección, ya que las elevadas temperaturas alcanzadas durante el centro del día, aconsejan que la recolección tenga lugar únicamente hasta mitad de la mañana. Esto hace que las alcaparras que crecen en la zona del litoral mediterráneo, proporcionan productos de calidades muy distintas. Los productos Turquía y Argelia son de peor calidad, al tener un sabor menos apetecible y menos dureza que los producidos en España.

La alcaparra es muy sensible a las heladas durante el periodo vegetativo. Sin embargo, cuando la planta se encuentra en el periodo de reposo vegetativo es capaz de sobrevivir a bajas temperaturas en forma de tocón, soportando temperaturas del orden de -8°C . En primavera, al principio de la brotación, requiere temperaturas moderadas, y temperaturas altas en verano, soportando 40°C (Psaras y Sofroniou, 1999). La planta de alcaparra se recupera rápidamente de los daños por granizo, al realizar una nueva brotación.

La mayoría de especies de *Capparis* pasan en invierno en forma de tocones que rebrotan al llegar la primavera con brotes mixtos o vegetativos.

En nuestras condiciones climáticas, el crecimiento vegetativo suele durar de 6 a 7 meses (de abril hasta octubre) dependiendo de la temperatura y de las heladas primaverales. La fertilidad de los nudos es máxima (cerca del 100 %) durante los periodos más calurosos y menor al inicio y al final de la temporada (Barbera *et al.*, 1991). Luna y Pérez (1985) encontraron una correlación positiva entre la temperatura y la productividad.

Los brotes de alcaparra presentan un crecimiento indeterminado, de modo que durante la época de desarrollo vegetativo coexisten hojas, botones de flor, flores y frutos de distintos tamaños. No obstante, las yemas de los diez (aproximadamente) primeros nudos de la base del brote generalmente no brotan y quedan latentes, y las diez (aproximadamente) siguientes pueden brotar o no; de la práctica totalidad de los nudos posteriores hasta casi la yema apical, emerge un botón floral que dará lugar, en caso de cuajado, a los frutos (Barbera *et al.*, 1991).

En cuanto a sus exigencias lumínicas, los mejores rendimientos en el cultivo de la alcaparra se obtienen durante los días largos y alta intensidad de radiación solar. En estas condiciones, además de aumentar las producciones, se alarga el periodo de crecimiento de la brotación que garantice una cosecha, de al menos, 3 meses.

La arquitectura decumbente de la alcaparra y la consistencia coriácea de sus hojas hacen que no presente problemas por viento para su crecimiento.

La alcaparra es una especie rupícola que crece en las rocas desnudas (Fotografía 1.3.1), grietas (Fotografía 1.3.2) y dunas de arena (Heywood, 1964), incluyendo alfisoles, regosoles y litosoles (Fici y Gianguzzi, 1997). Se adapta a todos los terrenos, pero prefiere los suelos profundos, sueltos y bien drenados (Barbera y Di Lorenzo, 1984, Özdemir y Öztürk 1996), silíceo-calizos y arcillo-calizos (Reche, 1967). Las plantas de alcaparra crecen en muchas murallas, como el “Muro de las Lamentaciones” en Jerusalén (Israel) (Fotografía 1.3.3), las murallas de Roma, Pisa, Milán, etc.;

Fotografías 1.3.4-1.3.10), ocasionando graves problemas para la protección de los monumentos (Sozzi, 2001).

Las interesantes características agronómicas de la alcaparra, como la alta resistencia a la iluminación, periodos de sequía, suelos ricos en sales y pobres en nutrientes, y sus escasos requerimientos en las operaciones culturales, aumentan el interés en preservar y valorizar esta especie.



Fotografía 1.3.1. Alcaparras creciendo entre las rocas en los aledaños de las murallas de Ibiza. Fotografía tomada en marzo de 2014.



Fotografía 1.3.2. Alcaparras creciendo entre las grietas de las paredes de piedra.



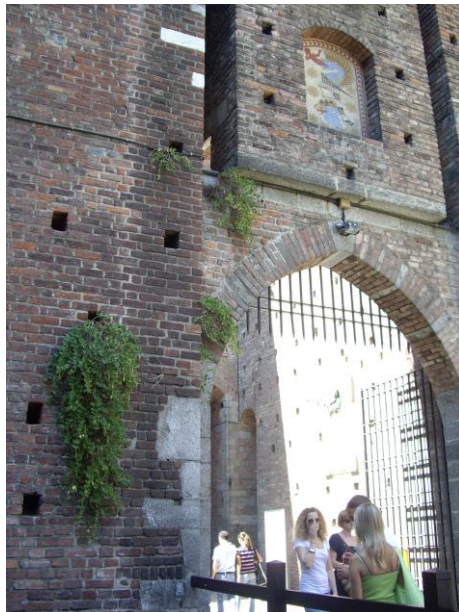
Fotografía 1.3.3. Alcaparras suspendidas entre las piedras del “Muro de la Lamentaciones” en Jerusalén.



Fotografía 1.3.4. Alcaparras suspendidas entre las piedras del Coliseo de Roma



Fotografía 1.3.5. Alcaparras suspendidas entre las piedras de las murallas de Pisa (Italia).



Fotografía 1.3.6. Alcaparras suspendidas entre las piedras de las murallas de Milan.



Fotografía 1.3.7. Alcaparras suspendidas entre las piedras del monasterio de Santa María de la Valldigna (Simat de la Valldigna; València).



Fotografía 1.3.8. Alcaparras suspendidas entre las piedras de las murallas de Gandía (València).



Fotografía 1.3.9. Alcaparras suspendidas entre las piedras de las murallas de Palma de Mallorca (Illes Balears).



Fotografía 1.3.10. Alcaparras suspendidas entre las piedras las murallas de Ibiza (Illes Balears).

Los suelos con un pH entre 6,1 a 8,5 son aptos para el cultivo de la alcaparra, estando el óptimo entre 7.5 y 8. La planta tiene una gran tolerancia natural a los terrenos salinos y a suelos de terrazas marinas, tanto en la etapa de establecimiento del cultivo como a la entrada a producción del primer año. La alcaparra es una planta halófito, que soporta conductividades eléctricas superiores a 50 mS/cm. No obstante, los cloruros le provocan toxicidades que se manifiestan en forma de clorosis foliar o necrosis (Sozzi, 2001).

1.3.2. Mecanismos de adaptación al estrés hídrico y suelos pobres

La alcaparra ha tenido que desarrollar una serie de mecanismos para poder reducir el impacto de las condiciones extremas en las que es capaz de vegetar y poder garantizar su supervivencia como son los ambientes semiáridos, con altos niveles de radiación, alta temperatura diaria e insuficiente agua en el suelo.

El cultivo es viable a partir de 120-140 milímetros de precipitación anual. Este arbusto es capaz de aprovechar la poca agua del suelo, no solo para resistir en los periodos de sequía, sino también mantenerse activa en el periodo de la floración. Para ello el género *Capparis* ha desarrollado un mecanismo fotosintético del tipo C3. Algunas características anatómicas de la alcaparra son típicas de las xerófitas: el tamaño de las células pequeñas, las paredes de las células epidérmicas gruesas y un parénquima en empalizada muy desarrollado en el mesófilo y una red de haces vasculares densa. *C. spinosa*, alcanza el mejor rendimiento fotosintético cuando el agua es muy limitada (Levizou *et al.*, 2004). La respuesta a la sequía también incluye propiedades de las paredes celulares y la regulación estomática, así como una elevada densidad de las raíces. El crecimiento radical no se inhibe bajo el déficit hídrico, pero las raíces se distribuyen en las diferentes capas del suelo y hacen el ajuste metabólico (Sozzi, 2001).

Las alcaparras son plantas estenohídricas (Rhizopoulou *et al.*, 1997) con altas tasas de fotosíntesis y una alta conductividad hidráulica debido a la presencia de vasos anchos, tanto en raíces como en tallos (Psaras y Sofroniou, 1999). En los ecosistemas mediterráneos, la alcaparra vegeta durante la prolongada sequía estival (de mayo a octubre) gracias a sus hojas gruesas anfistomáticas para favorecer la fotosíntesis (Psaras *et al.*, 1996); el mesófilo posee múltiples capas de células densamente empaquetadas, y los cloroplastos, situados junto a los espacios aéreos intercelulares, aumentan por unidad de superficie foliar (Psaras *et al.*, 1996). Estos factores son, presumiblemente, factores que facilitan la transpiración y la fotosíntesis bajo condiciones de escasez de agua (Rhizopoulou y Psaras, 2003). Por otra

parte, las hojas de *Capparis* son duras, brillantes y lustrosas y están cubiertas con cera epicuticular para ayudar en la conservación de la humedad (Oliveira *et al.*, 2003; Lansky, 2014).

La alcaparra también muestra características de una planta adaptada a suelos pobres, ya que la planta tiene la habilidad de maximizar la absorción de nutrientes del suelo. En condiciones ambientales de estrés, actúa aumentando la concentración de potasio y Calcio en las células manteniendo el equilibrio hídrico. Otros mecanismos de adaptación a suelos pobres son los tallos espinosos, alta relación raíz/brotes y una adaptación química al contener una concentración alta de caparidina para evitar el pastoreo. Por otro lado, su sistema de raíces micorrizadas profundas le permiten maximizar la captación de minerales y crecer con éxito en suelos muy infértiles y soportar el estrés ambiental (Pugnaire y Esteban, 1991). Andrade *et al.* (1997) han aislado cuatro cepas bacterianas fijadoras de nitrógeno diferentes en la rizosfera de la planta. Tal y como es típico en las plantas silvestres adaptadas a ambientes infértiles, las plantas de alcaparra cultivadas generalmente presentan un consumo de lujo de algunos nutrientes (Chapin, 1980; Lansky, 2014).

1.4. PLANTACIÓN Y LABORES DE CULTIVO

1.4.1. Ecotipos

El género *Capparis* en general y especialmente *C. spinosa* ha evolucionado en la naturaleza durante milenios. Por otra parte, los estudios genéticos realizados hasta la fecha son prácticamente nulos, aunque se sabe que existe una extensa variabilidad de caracteres dentro de *C. spinosa*, consecuencia de la posibilidad de intercrucamiento y de la ausencia de una selección estricta. Todo esto dificulta definir el material genético disponible en todo el mundo (Sozzi, 2001).

Los ecotipos de alcaparra se han ido seleccionando por los agricultores de acuerdo con algunas características de interés agronómico, y que deberían ser tenidos en cuenta en los actuales programas de mejora de la alcaparra, como la alta productividad, favorecida a su vez, por los tallos largos, entrenudos cortos y alta fertilidad de los nudos; los botones florales esféricos de color verde intenso, con brácteas no pubescentes cerradas, que aseguren gran calidad comercial y antesis tardía; ausencia de espinas estipulares lignificadas y fácil separación del tallo para simplificar las operaciones de recolección y poscosecha; apariencia agradable producto procesado; capacidad de reproducción vegetativa; resistencia al estrés hídrico, frío y plagas; características adecuadas de los ápices de los brotes (grosso y tierno) para su uso alimentario; fruto ovalado con pericarpio verde claro y pocas semillas para aumentar su apreciación en la alimentación.

Las principales colecciones de germoplasma se encuentran en Italia y España (Alkire, 1998). Los ecotipos comerciales italianos más atractivos son 'Nocellara' sin espinas y 'Nocella' con espinas muy pequeñas (Barbera *et al.*, 1991). Ambos son altamente productivos y producen alcaparras de alta calidad (forma casi esférica, conservando la integridad del botón floral después de la salmuera), con el inconveniente que las plántulas que se utilizan para su propagación no resisten la sequía.

Tradicionalmente se ha considerado que los ecotipos españoles más importantes son (Luna y Pérez, 1985; Sozzi, 2001):

- 'Común' o 'Del País' compuesta por una población heterogénea, de difícil propagación por estaquilla (Jiménez y Guillamón, 1986), con tallos espinosos, frecuentemente ramificados y que se secan completamente en invierno.
- 'Mallorquina', con tallos espinosos de fuerte crecimiento vegetativo. Altamente productiva en regadío, con botones florales son pequeños. Se cultiva sobre todo en Murcia y Almería. Tiene mayor facilidad para su propagación vegetativa que la 'Común' o 'Del País'.
- 'Italiana' es un ecotipo sin espinas, pero con menor potencial vegetativo y productivo.
- 'Rosa', 'Fulla Redona', 'Fina' y 'Boscana' son ecotipos, espinosos, pero altamente productivos, salvo la 'Boscana' que presenta una baja productividad y una baja calidad de sus botones florales. Sin embargo, 'Fulla Redona' puede ser considerado un ecotipo prometedor debido a la calidad y cantidad de sus botones florales.
- 'Redona' y 'Cavall' son ecotipos sin espinas, pero con baja productividad.

1.4.2. Propagación

La propagación de la alcaparra se realiza principalmente por semillas (propagación sexual) y multiplicación vegetativa (Maroto, 2002). Sin embargo, las cubiertas de las semillas son duras y su germinación deficiente y pueden presentar heterogeneidad genética. La propagación por estacas de alcaparra es difícil, especialmente durante la inducción del enraizamiento y no es comercialmente factible (Movafeghi *et al.*, 2008). Por estas razones, el establecimiento de un procedimiento de propagación eficaz es de particular interés para la multiplicación de la alcaparra.

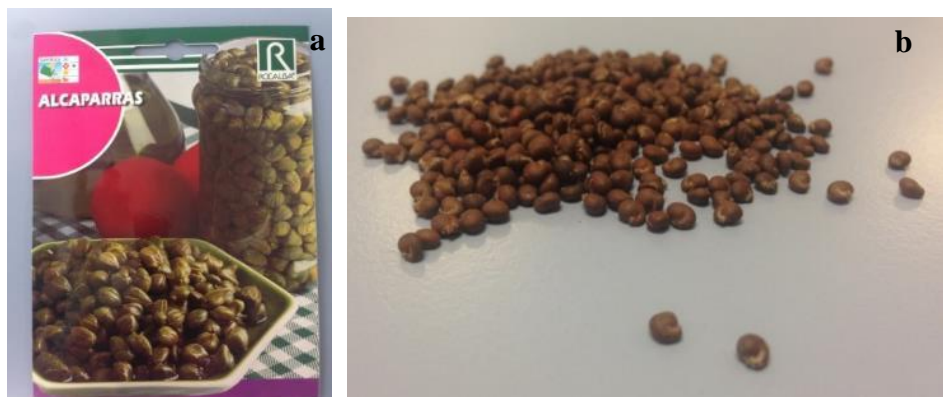
La dificultad en la propagación de la alcaparra es probablemente uno de los principales problemas que frenan su expansión industrial como materia prima para productos alimentarios, farmacéuticos y cosméticos, y como planta ornamental, entre otros fines. En los últimos años, se han publicado muchos trabajos de investigación (Tlili *et al.*, 2011; Gull *et al.*, 2015) en los que se demuestran las propiedades de los distintos órganos de la planta, pero la progresiva disminución de la superficie destinada a su cultivo en España ha dejado en evidencia la necesidad de abordar el tema de su propagación.

En la actualidad la alcaparra se reproduce mayoritariamente de forma sexual a través de semillas, pero también de forma asexual a través del estaquillado y en menor medida mediante el cultivo *in vitro*. La gran demanda actual de información respecto a su propagación por parte de los viveristas y la ausencia de plantones en el mercado para su plantación, queda justificada por las dificultades que presenta su propagación tanto sexual como asexual y, por otro lado, queda muy patente debido a la gran demanda de planta con fines ornamentales. En definitiva, se trata de un cultivo con posibilidades de expansión, pero las dificultades en su propagación, entre otras causas, lo han relegado a ser un cultivo marginal.

1.4.2.1. Propagación sexual

La reproducción mediante semillas (Fotografía 1.4.1), se suele realizar a principios de primavera y el material obtenido se trasplante en la primavera siguiente al lugar definitivo. Uno de los inconvenientes que presenta esta técnica es que se consiguen resultados de germinación muy bajos (Sozzi y Chiesa, 1995) inferiores al 5 % en la mayoría de los casos y, además existe una deriva genética que puede dar lugar a plantas con productos de menor calidad, menor productividad, resistencia a diversos factores como plagas y enfermedades.

La semilla constituye el producto final del proceso de crecimiento y desarrollo de planta progenitora (Hartmann *et al.*, 2014). Con este tipo de reproducción la descendencia resultante presenta variabilidad genética (Sozzi, 2001; Jiménez y Matías, 2010; Hartmann *et al.*, 2014).



Fotografía 1.4.1. Envase de semillas comerciales (a) y semillas recolectadas en la parcela de la UPV (b).

Los factores internos de la semilla (viabilidad, latencia y cantidad de reservas) y los factores externos (agua, temperatura y luz) afectan a la

germinación de la semilla. Para que la semilla germine, es necesario que sea viable, que no esté latente y que las condiciones ambientales sean favorables (humedad, temperatura y concentración de oxígeno en la atmósfera).

En el apartado 2.1 de esta tesis doctoral se presenta de detalladamente las características de las semillas, la latencia y los procesos de germinación y de deterioro de las semillas.

La alcaparra produce muchas semillas por fruto y puede producir muchos frutos, pero el porcentaje de germinación de las semillas es muy bajo (Pascual *et al.*, 2004), a pesar de lo cual la propagación de la alcaparra se lleva a cabo generalmente por semillas debido a las dificultades que presenta también el enraizamiento de las estaquillas. Según Barbera y Di Lorenzo (1982; 1984), los porcentajes de germinación obtenidos en la Isla de Pantelleria (Italia) no superaron el 5 % tras un periodo de 2-3 meses. Resultados similares fueron los encontrados por Cappelletti (1946) en Italia y, Luna y Pérez (1985) en España después de la siembra directa bajo condiciones de campo. Bond (1990) en Estados Unidos, utilizando semillas frescas de alcaparra mantenidas a 18°C, obtuvo porcentajes de germinación del 10 % durante los diez primeros días siguientes a la siembra y un 5-10 adicional total de 15-20 % durante setenta días.

El aumento del porcentaje de germinación de las semillas de la alcaparra está siendo objeto de estudio por investigadores de muchas universidades y centros de investigación, incluyendo el Departamento de Producción Vegetal de la Universidad Politècnica de València. Entre los estudios realizados, se ha intentado incrementar la germinación, a través del incremento de la imbibición, aumentando de la permeabilidad de la cubierta, con distintos tipos de escarificación (mecánica, química, térmica, etc.), así como romper la latencia fisiológica mediante la utilización de ácido giberélico (Pascual *et al.*, 2004); también se ha estudiado la influencia de distintas características del fruto (la posición en la rama, tamaño grado de maduración; Pascual *et al.*, 2003), y los efectos del envejecimiento acelerado de las semillas (Pacual-Seva *et al.*, 2009).

1.4.2.2. Propagación vegetativa

Los vegetales pueden propagarse vegetativamente a través de varios métodos, pudiendo distinguirse los que se producen de forma natural (a través de bulbos, rizomas, tubérculos, estolones, etc.) de los que se dan de forma artificial (acodo inducido, estaquillado, injerto y cultivo *in vitro*; Huanca, 2010).

La alcaparra se puede propagar vegetativamente a través de estaquillas de tallo o por división de la corona de la planta. En el caso de la división de la corona se cortan varios fragmentos de la misma e inmediatamente se trasplantan al lugar definitivo. En el estaquillado de tallo las estaquillas se obtienen generalmente en parada vegetativa, y se trasplantan inmediatamente o se conservan a bajas temperaturas hasta el momento del trasplante, a principios de primavera.

Mediante ambas técnicas se obtienen individuos genéticamente iguales a sus progenitores. La uniformidad es un factor muy importante, ya que habitualmente se desea mantener todas las características de la planta madre en cuanto a rendimiento y calidad de la producción. Este tipo de técnicas de propagación son posibles gracias a la totipotencia de las células vegetales y a su desdiferenciación.

En el estaquillado se obtiene el material vegetal de plantas madre sanas y vigorosas (Huanca, 2010). En muchas especies, particularmente en *C. spinosa*, la posición de la estaquilla en la rama influye a la hora de enraizar y brotar. Se pueden diferenciar varios tipos de estaquillas de tallo (Hartmann *et al.*, 1990): de madera dura, obtenidas en invierno cuando la planta está en parada vegetativa, es decir, en especies caducifolias después de que hayan caído las hojas y antes de que aparezcan los nuevos brotes; de madera semidura, obtenidas en verano y principios de otoño antes de entrar en reposo; y de madera suave obtenidas en primavera tras la brotación.

La estaquilla debe colocarse en un medio que sea favorable para poder desarrollarse. El medio de cultivo es un factor de vital importancia para la propagación por estaquillado, ya que no solo es necesario que contenga los componentes óptimos para el cultivo sino también, que no contenga aquellos que sean perjudiciales. Las principales características a tener en cuenta son: el pH, la capacidad de absorción y retención de agua y de aireación, la salinidad y el contenido de nutrientes. Existen varios medios de cultivo que se han comprobado que son adecuados para el estaquillado de *C. spinosa*, como la turba *sphagnum*, que es uno de los sustratos que mejor se comporta gracias a sus características físicas, químicas y biológicas, sobre todo en mezclas con perlita, a distintas proporciones. Entre sus principales características destacan, una alta retención de agua y nutrientes (lo que permite regular su aporte en función de las necesidades), ausencia de patógenos y plagas (debido a su origen), pH ácido, y un precio competitivo (Schmilewski, 2009). La fibra de coco es un sustrato que proviene de las fibras del mesocarpo del coco, y cuyas características físico-químicas pueden variar en función de su origen, del grado de envejecimiento y del tratamiento empleado; en general, se caracteriza por tener una buena rehumectación y un precio un poco superior al de la turba.

Tras un periodo en el que las estaquillas están en un ambiente adecuado, en la parte basal de las mismas, que está inmersa en el sustrato, comienzan a formarse las raíces, mediante las cuales la nueva planta podrá absorber agua y nutrientes para sobrevivir. El proceso de formación de las raíces es un proceso endógeno que depende de varios factores (Huenca, 2010), principalmente de reguladores del crecimiento, en concreto las auxinas, que favorecen el enraizamiento (Jordán y Casaretto, 2006; Huenca, 2010) y factores ambientales, como el agua, la aireación del sustrato, la luz, la temperatura, y la polaridad (Hartmann *et al.*, 1990). Paralelamente una o más yemas brotan, debiendo procederse al repicado antes de que las raíces comiencen a enrollarse, para que el sistema radical crezca adecuadamente y se forme en una planta adulta.

Tradicionalmente de *C. spinosa* las estaquillas se han realizado a partir de madera dura situada en la base de las ramas, pudiéndose obtener resultados similares (que son relativamente bajos) con madera semidura, a condición de que en la axila de alguna hoja esté presente la yema (Pascual *et al.*, 2007). Con estaquillas de madera suave, con la aplicación de ácido indolbutírico se han obtenido enraizamientos del orden del 75% (Pascual *et al.*, 2007).

1.4.3. Labores de cultivo

1.4.3.1. Establecimiento de la plantación

La alcaparra es un arbusto perenne con una vida productiva superior a 30 años. La elección de su emplazamiento es de suma importancia. El suelo, la disponibilidad de agua y el clima son los principales aspectos a considerar. Las propiedades físicas del suelo son particularmente importantes al desarrollar un extenso sistema radical que crece mejor en suelos profundos, no estratificados, de textura media y arcillosa (Luna y Pérez, 1985). Antes del establecimiento de la plantación es conveniente realizar labores profundas (Massa, 1987), que en suelos rocosos pasa por excavar hoyos individuales para cada planta con una retroexcavadora.

El marco de plantación más habitual es el rectangular o cuadrado (Fotografía 1.4.2), con espaciamientos que dependen de factores como la fertilidad del suelo, el manejo en secano o regadío, y el vigor y hábito vegetativo del ecotipo. En cualquier caso, la separación entre plantas y entre filas varía de 2 a 5 m (Bounous y Barone, 1989), considerándose ideal una densidad de plantas adultas de 1800 a 2200 por ha⁻¹. Tanto en España como en Italia la alcaparra suele cultivarse como un cultivo intercalado en otros (Fotografía 1.4.3), para mejorar los rendimientos de la tierra y de la mano de obra, aumentar la eficacia de los recursos reduciendo los picos de trabajo y

reducir la dependencia de un único cultivo. En estos casos, los cultivos a los que tradicionalmente se ha asociado el cultivo de la alcaparra son la vid y el olivo y el almendro (Lozano Puche, 1977); en la actualidad en la isla de Mallorca se encuentra asociado al almendro y al trigo (Sozzi, 2001).

El laboreo del suelo para el control de las mala hierbas se realiza cuando la planta de alcaparra se encuentra en forma de tocón. El trasplante se realiza a final del invierno, de enero a marzo, cuando las plántulas o esquejes enraizados están en reposo y, en todo caso, después de las últimas heladas. La mayoría de las plantas se trasplantan a raíz desnuda con las raíces podadas y extendidas para evitar su tendencia natural a enrollarse unas con otras. Sin embargo, cuando el estrés hídrico es el principal factor limitante en el trasplante, se suelen utilizar plantas con cepellón, cultivadas en contenedor. La siembra directa en campo es una práctica alternativa, sobre todo en laderas rocosas, entornos naturales con fines paisajísticos (Bounous y Barone, 1989).

Durante los dos primeros años después del establecimiento de la plantación, la competencia de las malas hierbas puede ser particularmente importante. La presencia de éstas dificulta las labores de cosecha, además de competir con el cultivo por la captación de agua, nutrientes, luz y por el espacio físico disponible. En estos casos se recomiendan pases periódicos con la grada de discos o la fresadora. Los tratamientos con herbicidas de preemergencia producen resultados satisfactorios siempre que se evite la pulverización directa sobre el tocón o los tallos de la alcaparra. Después del establecimiento de la plantación, la mayor parte del suelo se cubre rápidamente por las ramificaciones de la alcaparra y el desarrollo de malas hierbas se reduce de una forma importante (Fairushina, 1994).



Fotografía 1.4.2. Plantaciones regulares de alcaparras en un campo de Campos (a) y otro de LLubí (b) en Mallorca.



Fotografía 1.4.3. Campos de secano donde se cultivan cereales, almendro y alcaparras. Las alcaparras empiezan a expandirse sobre la superficie del suelo una vez finalizada la siega del cereal.

1.4.3.2. Poda

La poda de la alcaparra debe realizarse en invierno, una vez transcurrido el periodo de temperaturas más bajas y la planta se encuentre todavía en reposo vegetativo. En los primeros años es recomendable que la poda se realice a 10 cm de la cepa para aumentar la productividad inicial al lograr una mayor cantidad de yemas. A las plantas adultas les beneficia de una poda corta que reduzca las ramas a una longitud de 1 cm (Barbera y Di Lorenzo, 1984) a 3 cm de la cepa (Luna y Pérez, 1985). Es importante dejar varias yemas por rama (Sozzi, 2001) del año, ya que en cada campaña únicamente los tallos de un año de edad producen yemas florales.

A principios de verano, cuando la planta se encuentra en crecimiento activo, la poda en verde tiene como objetivo eliminar los tallos delgados, dejando que los mejor orientados vayan cubriendo toda la superficie del suelo para obtener una ramificación abierta, que permita que todas las partes de la planta reciban la radiación solar uniformemente y de esta manera se favorezca la producción. Posteriormente puede realizarse el despunte de los brotes tiernos para provocar una mayor ramificación y el correspondiente fructificación.

1.4.3.3. Nutrición y Fertilización

En investigaciones realizados en el Centro de Edafología y Biología Aplicada del Segura (Luna y Pérez, 1985) se estudiaron deficiencias nutricionales y la respuesta productiva al aporte de diferentes dosis y abonos en el cultivo de la alcaparra, recomendando diferentes dosis en función de la edad de la planta y de los distintos niveles de fertilidad del suelo. El citado estudio recomendaba aportar el fósforo y el potasio cada dos o tres años, mientras que se recomendaba aportar el nitrógeno, en forma amoniacal, anualmente, al final del invierno, antes de brotarla planta.

Massa (1987) sugiere como fertilización de fondo aportes de 100, 400 y 150 kg ha⁻¹ de sulfato amonio, superfosfato cálcico y cloruro potásico, respectivamente. Se recomienda ir aumentando gradualmente la dosis de nitrógeno aportada hasta la estabilización de la producción al sexto año después de la plantación, con aportes de 250, 50 y 50 Kg ha⁻¹ de sulfato amónico, superfosfato de cal y sulfato de potasio, respectivamente. La fertilización orgánica es muy deseable, sobre todo en los pozos realizados en suelos rocosos (Barbera *et al.*, 1991).

1.4.3.4. Riego

La alcaparra se cultiva mayoritariamente en áreas de secano, marginales, y generalmente recibe pocas atenciones por parte de los agricultores. Sin embargo, la alcaparra agradece el riego durante el primer año de plantación. A pesar de que tolera bien el estrés hídrico, el agua es el factor más limitante de la producción. Los rendimientos bajo riego duplican e incluso se triplican a los obtenidos en secano (MAPAMA, 2017), aunque la planta tiende a ser más propensa a las enfermedades (Jiménez, 1987). En ocasiones se utiliza el acolchado, incluido la colocación de piedras alrededor de las plantas jóvenes para protegerlas de la acción del viento, con lo que se reduce la evaporación.

1.4.3.5. Plagas y enfermedades

La rusticidad de las plantas del género *Capparis* se pone de manifiesto en que no resulta afectado de manera importante por plagas y enfermedades. En las alcaparras silvestres las enfermedades y plagas no parecen ser un gran problema en general. Sin embargo, cuando se establecen los cultivos se han detectado algunas especies fitófagas que atacan la alcaparra en sus principales áreas de producción. Los tratamientos insecticidas para su control están muy restringidos debido al corto intervalo

entre dos pasadas en la recolección, con el fin de evitar residuos tóxicos en la cosecha al realizarse de manera periódica con intervalos de días. Una ventaja de la recolección de los botones florales, manualmente y con periodicidad regular, es que las plagas son rápidamente observadas y en ocasiones pueden ser destruidas manualmente, evitando por lo tanto el uso de insecticidas.

Una de las plagas más importantes la mosca de la alcaparra (*Capparimyia savastanoi* Mart., Trypetidae) (Maroto, 2002). En verano, cuando las poblaciones son altas, se combate con cebos de proteínas hidrolizadas envenenados (Longo y Siscaro, 1989; Longo, 1996). En las últimas décadas se ha encontrado atacando las plantaciones de alcaparra la chinche bagrada (*Bagrada hilaris* Bm., Pentatomidae), que es un insecto polígrafo que se alimenta de especies de muchas familias como Brassicaceae, Malvaceae y Asteraceae (Gunn, 1918; Genduso, 1990). Para controlar este insecto se utilizan formulaciones de piretroides. *Phyllotreta latevittata* Kunsch, Chrysomelidae, provoca lesiones ovales a redondas en hojas, amarilleamiento de hojas y podredumbre del tallo (Sozzi, 2001).

Durante el verano la planta puede ser atacada por diversos piéridos que se alimentan del follaje, como *Pieris rapae* L., *Pieris brassicae* (Maroto, 2002) y *Colotis evagore* Klug (Pittaway, 1979, 1980, 1981, 1985; Fernández García, 1988; Jordano *et al.*, 1991; Haeger y Jordano, 1986). Las larvas de estos lepidópteros pueden dejar a la planta desprovista de hojas en un corto periodo de tiempo (Massa y Luna, 1985; Sozzi, 2001).

El gorgojo *Acalles barbarus* Lucas, Curculionidae, causa daños al sistema radical de plantas adultas débiles, previamente atacadas por otros insectos (Liotta, 1977; Sozzi, 2001).

El hemíptero *Eurydema ornata* L. ataca a las hojas de la alcaparra y puede causar serios daños a las plantas. Los también hemípteros *Holcostetus punctatus*, *Carpororis lúnula* y el insecto verde *Nezara viridula* L. (chinche verde) de escasa agresividad han causado daños en el cultivo de la alcaparra. Todos estos hemípteros pueden ser controlados usando metil-clorpirifos.

En la fase de vivero, frecuentemente, las plantas se pueden ver afectados por hongos del suelo como *Phytium* sp, *Verticillium* sp y *Fusarium* sp. El hongo del óxido blanco (*Albugo capparidis* De By.) es uno de los más importantes en el cultivo de la alcaparra que afecta sobre todo a las hojas y las flores de la planta. En la India, *Neoramularia capparidis* produce en las hojas pequeñas manchas de color blanco-grisáceo con un borde estrecho de color marrón (Bagyanarayana *et al.*, 1994). En California se ha citado que *Botrytis* spp. y *Pythium* spp. atacan a las plantas de alcaparras (Sozzi, 2001).

Majorana (1970) detectó en Sicilia el *caper vein banding virus* (Cap VBV) incluido el grupo de los carlavirus. Gallitelli y Di Franco (1987) aislaron este virus y demostraron que infecta a la planta de un modo asintomático, sugiriendo el nombre alternativo de *caper latent virus* (CapLV). El verdadero agente causante del *vein banding* puede ser el radovirus *caper vein yellowing virus* (CapVYV) que puede infectar a la alcaparra simultáneamente con el CapLV (Sozzi, 2001). Pruebas serológicas posteriores demostraron que CapVYV es indistinguible del *Pittosporum vein virus* (PVYV).

1.4.3.6. Recolección y rendimiento

La recolección de alcaparras, antes de los años 70 del siglo pasado la realizaban las mujeres de plantas silvestres en tierras marginales, aportando un ingreso significativo para muchas familias.

La importación de alcaparras y alcaparrones por empresas transformadoras y comercializadoras de países con menor costo de mano de obra, hizo que su recolección no fuera rentable.

En algunas zonas, como la comarca del Bajo Cinca (Huesca) se ha vuelto a recuperar la explotación de plantas silvestres, comercializadas por empresas locales, ofreciendo un producto de alta calidad.

En el cultivo de las alcaparras existen dos operaciones que resultan muy costosas, la plantación y cosecha. El periodo que necesita una mayor dedicación y que concentra los mayores costes es, sin duda, la recolección. Además, una adecuada planificación de la recolección redundará en una mejora en la calidad de las alcaparras. Los botones florales (alcaparras) deben recolectarse con un diámetro de aproximadamente 7 mm, para no tener penalizaciones de importantes descuentos que se practican en la comercialización a los botones florales de mayor diámetro. La recolección de los botones florales más pequeños requiere mayor frecuencia de recolección y dan un menor rendimiento, con el mismo tiempo de recolección. La cosecha de la alcaparra es escalonada, como consecuencia del crecimiento indeterminado del arbusto, comenzando con una frecuencia de cosecha semanal, para posteriormente ir acortando esta frecuencia a dos veces por semana cuando se acelera la producción de botones florales.





Fotografía 1.4.4. Recolección tradicional de la alcaparra. Fuente: Ecomuseo Son Lladó (a). Can Valer de Campos (b, c y d).

En las condiciones climáticas de Valencia y de las Islas Baleares, la planta brota habitualmente en el mes de abril y en mayo empieza a emitir los primeros botones florales, cuya recolección puede prolongarse hasta finales de octubre. Entre el cuarto y quinto año se considera que se ha alcanzado la plena producción, con rendimientos de 2000 a 4000 kg ha⁻¹.

La cosecha puede consumir las dos terceras partes de la mano de obra total del cultivo al realizarse manualmente (Fotografía 1.4.4). La cosecha es difícil y requiere mucho tiempo, debido al carácter decumbente de las ramas, a las altas temperaturas e insolación durante el verano, y al pequeño tamaño de los botones florales. Además, la cosecha tiene que realizarse en muchos pases, a medida que los botones florales alcanzan el tamaño comercial. Por otra parte, el crecimiento indeterminado de los brotes con una producción continua hace imposible que, en la actualidad, la recolección mecánica sea una opción viable. Cuando el cultivo está en plena temporada de recolección, se calcula que, en una plantación de regular, un operario puede recoger entre 10 y 15 kg de alcaparras por día (Sozzi, 2001).

La temperatura es el principal factor ambiental que afecta durante la época de la recolección. En España, la producción de alcaparras tiene lugar desde mayo hasta octubre, dependiendo evidentemente del ecotipo de que se trate. El pico de producción del ecotipo 'del país' tiene lugar entre junio y julio, mientras que el del ecotipo 'Mallorquina' es en julio-agosto.

La recolección del botón floral se realiza manualmente por pinzamiento del pedúnculo, operación obstaculizada, en su caso, por la presencia de espinas (Mallor *et al.*, 2016). Las cosechas sucesivas están programadas para maximizar el rendimiento de las alcaparras más pequeñas, las de mayor valor (Tabla 1.4.1). Sin embargo, los botones que no se recolectan en un pase, seguirán desarrollándose y pueden aprovecharse en forma de frutos, en las pasadas posteriores (Tabla 1.4.2). La frecuencia de pases en la recolección tiene una relación directa con la calidad final del producto (Tabla 1.4.1). Sin embargo, determinar el intervalo de tiempo óptimo es una decisión difícil porque hay diferentes factores complejos a

considerar. Los intervalos de tiempo más cortos entre las cosechas sucesivas resultan en un producto de alta calidad; por otra parte, el número de botones por unidad de peso aumenta cuando el tamaño de la alcaparra disminuye y los costes de la cosecha aumentan cuando más cortos son los intervalos entre pases.

Tabla 1.4.1. Sistema de clasificación de alcaparras. BOE 100 del 26 de abril de 1984.

DENOMINACIÓN COMERCIAL	Diámetro (mm)
Non Pareilles	< 7
Surfines	7-8
Capucines	8-9
Capotes	9-11
Finas	11-13
Gruesas	> 13

Tabla 1.4.2. Sistemas de clasificación de alcaparrones. BOE 100 del 26 de abril de 1984.

DENOMINACIÓN COMERCIAL	Diámetro (mm)
Finos (F)	< 13
Medianos (M)	13-20
Gruesos (G)	> 20

En general, se considera que los intervalos de 7 a 10 días entre pases sucesivos de recolección son apropiados, pero suelen acortarse a 3-5 días para obtener producción de mayor calidad, tal y como sucede en España. Habitualmente en Pantelleria y Salina suelen darse de 8 a 10 recolecciones por año, y en la Península Ibérica de 12 a 14.

Aunque depende del ecotipo, de la zona de producción, y en su caso del manejo del cultivo, puede decirse que los rendimientos anuales medios oscilan entre 2 y 3 kg año⁻¹ en plantas silvestres y de 6-9 kg año⁻¹ cuando se cultiva en suelos fértiles y con un manejo adecuado de riego (Lozano, 1977; Jiménez, 1987).

1.5. POSTCOSECHA

1.5.1. Alcaparras

Las alcaparras una vez recolectadas, se limpian (Fotografía 1.5.1), separando los restos de hojas, ramillas y pedúnculos antes de realizar una primera selección, en la que se eliminan los botones florales manchados, rotos y los de gran tamaño y/o que estén próximos a su apertura. Este proceso de acondicionamiento debe realizarse inmediatamente después de la cosecha y, en el caso de España, lo realizan los comerciantes locales, cooperativas o asociaciones de productores. Después, las alcaparras se someten a un primer tamizado para ser clasificadas en 4 calibres diferentes: diámetro ≥ 13 mm, de 11 a 12 mm, de 8 a 10 mm, y de 5 a 7 mm. Cuanto más pequeña es la alcaparra más se apreciada es en el mundo de la gastronomía, y como se ha indicado anteriormente, más costosa es su recolección. Esta clasificación permite incentivar al productor por las alcaparras más pequeñas al tener un mayor valor comercial y, a su vez, facilita los siguientes pasos industriales.



Fotografía 1.5.1. Fotografía de la primera limpieza y clasificación de alcaparras (Mallorca). Fuente: Can Valer de Campos.

Tras la clasificación por calibres, las alcaparras son pretratadas en bidones con salmuera (Fotografía 1.5.2), generalmente entre el 16 y 20 % de NaCl p/v, aunque la reglamentación española acepta el uso de concentraciones de salmuera de hasta 25°Baumé, efectuando su recambio cada 5 días aproximadamente. Se deben realizar controles periódicos para asegurar que la salmuera cubra completamente el producto durante, al menos, 20 o 30 días (Luna y Pérez, 1985). Este proceso de fermentación puede durar hasta 4 meses y permite conservar el producto acabado hasta que se comercialicen, ya sea a granel o procesado.



Fotografía 1.5.2. Fotografía de las botas de madera que se utilizaban hace unas décadas en Mallorca para el curado de las alcaparras. Fuente: Can Valer de Campos.

Al finalizar la fermentación, el pH de la solución ha descendido lo suficiente como para detener el desarrollo de microorganismos no deseables que impidan que las alcaparras tengan un buen sabor y aceptación por parte de los consumidores y estas alcancen las características físico-químicas que permiten su conservación por un largo periodo de tiempo. En todo caso, para evitar el desarrollo de microorganismos se puede realizar una pasteurización del producto final (80°C, durante 15 minutos). La pasteurización se puede sustituir por 6-10 % de NaCl y 1 % de acidez como ácido acético (p/v) en el producto final (Alvarruiz *et al.*, 1990; Özcan y Akgül, 1999b; Jiménez, 2014).

Una vez finalizado el periodo de curado, se lleva a cabo el acondicionamiento industrial final, las alcaparras se enjuagan con varios cambios de agua con el objetivo de desalar y eliminar todos los sedimentos. En este sentido, las alcaparras pueden considerarse como un producto estable durante el almacenamiento (Ranken, 1988). Cuando ya están listas para su consumo se eliminan los botones florales dañados y luego se vuelven a calibrar, de acuerdo con el sistema de clasificación internacional (Tabla 1.4.1). A continuación, se pueden preparar de varias maneras y se envasan como producto acabado, aunque en la mayoría de los casos para su comercialización se les añade vinagre, sin necesidad de añadir ningún conservante. En algunos casos, se evita el NaCl al sumergir las alcaparras con ácido acético diluido o vinagre de malta destilado (4,3 a 5,9% de ácido acético). En Italia, el producto final se trata con sal seca; esta preparación disminuye el costo de transporte y otorga un sabor más intenso. En España, se realiza un tratamiento similar con las alcaparras de gran diámetro; las alcaparras se escurren y se mezclan con sal seca (20% máximo).

Los estudios realizados por Alvarruiz *et al.* (1990) demostraron que tanto las características organolépticas como la conservación del producto final resultaron ser las mismas durante 27 meses cuando las alcaparras habían sido pretratadas con 10, 15 o 20 % de NaCl. Las alcaparras también se pueden preparar en vinagre asegurándonos de que todas las alcaparras permanezcan sumergidas (al menos 4% de acidez como ácido acético durante 30 días) en una relación 1:1 (p/v) (Reche, 1967). En Italia, los

productores preparan las alcaparras en tanques de cemento, barriles de PVC o de madera, colocando capas NaCl (10-15% p/p) durante 7-8 días. Este proceso se repite una o dos veces (Barbera, 1991).

La industria de las alcaparras suspendió el uso del aceite de oliva en las preparaciones de alcaparras debido a su alto costo. Otras preparaciones especiales, incluido el vinagre de vino, con o sin adición de estragón, *Artemisa dracunculus* L. (Vivancos, 1948), también son costosas y se utilizan exclusivamente con alcaparras de pequeño diámetro. A las alcaparras exportadas a Dinamarca o a algunos países del norte de Europa se les añaden ingredientes edulcorantes, como el azúcar (González, 1973).

Los encurtidos de alcaparra se suelen comercializar en tarros de vidrio, concretamente el vidrio de sodo-cálcico convencional; los principales motivos de la utilización de este tipo de material es su impermeabilidad a diferentes gases y su hermeticidad, evitando así reacciones que degraden al producto (Trenor *et al.*, 2014). En el comercio se encuentran envases de diversos tamaños, de boca ancha y cierre tipo twist-off. Los materiales que se utilizan para el cierre son tapones metálicos con juntas de plástico, asegurados por una película en caliente de un complejo base de aluminio termosellado o pegado sobre la cara superior de la boca. Estos cierres permiten que la calidad del contenido se mantenga durante un largo periodo de tiempo (Pérez y Rodríguez, 2012). El volumen de los envases es muy variable, desde barriles de PVC o de madera de 180-200 kg para la industria de la salmuera, pasando por los barriles de 40 kilogramos se utilizan para envasar las alcaparras "non pareil" y "surfine", dependiendo del país que las importa. Para la venta al por menor, las alcaparras se embalan en diversos tipos de botes de cristal o de plástico que contienen de 20 g a 5 kilogramos, o bolsitas translúcidas de 0.1 a 1 kilogramo. Los frascos y las bolsas de cinco kilos suelen venderse a restaurantes y *coffee-shops*.

1.5.2. Alcaparrones

Tradicionalmente, los alcaparrones se fermentan sumergiéndolas en agua durante 4-7 días. Esta inmersión produce una fuerte fermentación acompañada de un cambio de color (de verde a amarillento) y la pérdida de textura debido a la descomposición de la carne y acumulación de gas. Este paso afecta el valor del producto y se ha demostrado que es innecesario (Sánchez *et al.*, 1992). Los lactobacilos muestran tasas de crecimiento más rápidas con concentraciones bajas de NaCl (Sánchez *et al.*, 1992), pero la fermentación debe ser controlada continuamente (Özcan 1999a). Los rendimientos se incrementan mediante el uso de acetato de sodio al 0,35% (Sánchez *et al.*, 1992). La fermentación debe durar de 20 a 25 días. Las salmueras con un 10% (Sánchez *et al.*, 1992) al 15% (Özcan 1999a) de NaCl crean un ambiente favorable para el almacenamiento de la baya en vinagre. Los ácidos sórbico y benzoico, así como sus correspondientes sales de sodio y potasio, se utilizan como conservantes durante el envasado final.

1.6. COMPOSICIÓN Y APROVECHAMIENTOS

1.6.1. Composición

El componente principal de los botones florales de la alcaparra es el agua (Tabla 1.6.1), presentando una proporción del 88%, seguido de los hidratos de carbono y de las proteínas. Las alcaparras son recomendadas para dietas hipocalóricas por su bajo contenido graso y elevada cantidad de agua. No se recomienda en ningún momento para dietas de pacientes hipertensos, por su alto contenido en sodio, que provoca aumentos de presión arterial, pudiendo provocar daños importantes en el cerebro, corazón y riñones. Respecto al resto de micronutrientes, se puede destacar el elevado contenido en calcio y, el bajo contenido en hierro. En cuanto al aporte vitamínico, destaca el contenido en vitaminas C y A, que pese a encontrarse en pequeñas proporciones, destacan frente al resto (MAPAMA, 2017).

Tabla 1.6.1. Información nutricional de 100 g de alcaparras.

Energía (Kcal)	44
Agua (g)	88,6
HC (g)	4,9
Proteínas (g)	2,4
Lípidos (g)	0,9
Colesterol (mg/1000 kcal)	0
Fibra (g)	3,2
Sodio (mg)	2964
Hierro (mg)	1,67
Calcio (mg)	40

En general, las alcaparras más pequeñas presentan menores contenidos de agua, almidón y carotenoides, y mayores niveles proteínas, calcio y cenizas (Rodrigo *et al.*, 1992). Por otra parte, los tratamientos de alta salinidad afectan en gran medida la composición de las alcaparras; estos tratamientos disminuyen los contenidos en fibra, proteínas, minerales (Mg, K, Mn) y vitaminas (tiamida, riboflavina, ácido ascórbico), mientras que aumentan el contenido en cenizas (Nosti y Castro, 1987).

Las alcaparras son ricas en ácidos linoleico y linoléico. Las semillas contienen niveles elevados de ácido oleico y linoleico, y un menor contenido en ácidos grasos saturados que las semillas de otras especies de *Capparis*. Las semillas, botones florales, flores, hojas, tallos y raíces contienen componentes lipofílicos, como esteroides, tocoferoles y carotenoides, utilizados en preparados farmacéuticos.

En el fruto de *C. spinosa* se ha encontrado el flavonoide, O-metil flavonol, isorhamnetina, que es el responsable de las manchas amarillas de los dedos y las manos después de horas de manipulación de los frutos y brotes de la planta de alcaparra. En las alcaparras se han encontrado compuestos volátiles como los isotiocianatos, glucosinolatos, triterpenoides, entre otros. Los beneficios médicos, farmacéuticos y nutricionales de los glucosinolatos e isotiocianatos están reconocidos en carcinogénesis, enfermedades cardiovasculares y neurológicas (Dinkova-kostova y Kostov 2012, Boddupalli *et al.*, 2012), también forman parte de un potente mecanismo de defensa de la planta contra los patógenos (Nwachukwu *et al.*, 2012).

Brevard *et al.* (1992) identificaron 160 componentes del sabor de las alcaparras encurtidas analizadas, incluyendo azufre elemental (S₈) y más de 40 compuestos que contienen azufre, entre ellos tiocianatos e isotiocianatos. Los isotiocianatos son liberados y los compuestos volátiles de azufre proporcionan su aroma distintivo pero sutil de azufre similar al de la col en fermentación.

Los alcaloides presentes en *Capparis* spp. están entre las clases más fisiológicamente activas de los compuestos encontrados en las plantas,

afectando a menudo a funciones neurológicas y otras funciones físicas vitales en animales. El alcaloide más investigado es la estaquidrina, que es la betaína de la prolina y está presente en todos los órganos de *C. spinosa*. Los frutos de *Capparis* contienen vitaminas C y B, solubles en agua, y vitaminas E (tocoferoles) y vitamina A (carotenoides), liposolubles.

1.6.2. Aprovechamientos e industrialización

Los usos de las alcaparras han ido variando a lo largo de la historia, las diferentes culturas han utilizado la alcaparra de diferentes formas, proporcionando sabor a la dieta mediterránea. El género *Capparis* muestra una gran adaptabilidad a los diferentes entornos naturales en los que se ha encontrado y esto sirve como ejemplo de la infinita variedad de respuestas humanas a las que ha dado lugar. Desde los tratados antiguos que informan tanto de sus capacidades medicinales como afrodisíacas, diuréticas y estimulante estomacal, hasta su utilización en platos típicos de nuestra cocina. En la comarca del Bajo Cinca, en la provincia de Huesca, han sabido promocionar este peculiar producto, ofreciendo envases de alcaparras deshidratadas en forma de polvo, ideales para dar sabor a salsas y guisos, concentrando todo el aroma de la alcapara (Fotografía 1.6.1 b). Sin embargo, la alcaparra es conocida sobre todo por el valor alcanzado en las últimas décadas a través del consumo los botones florales (alcaparras) y en menor medida por los frutos (alcaparrones) y los brotes tiernos, aportando un sabor único a las comidas, siendo muy apreciados para el condimento y para la fabricación de medicamentos y cosméticos. Debido a estas características, este arbusto se ha convertido en un cultivo valioso y especializado de gran importancia económica en la cuenca mediterránea tanto para el mercado local como para la exportación durante las últimas décadas (Carra *et al.*, 2012 a).

1.6.2.1. Uso alimentario

El cultivo de la alcaparra tiene, como objetivo principal, el aprovechamiento de sus partes comestibles que, previamente preparadas, han sido usadas durante siglos en la cocina. Las alcaparras son un ingrediente común en la cocina mediterránea, especialmente chipriota, italiana, eólia y maltesa, como condimento o aderezo (Jiang *et al.*, 2007). Las alcaparras aportan productos vegetales de alto valor en la alimentación hasta el punto de ser consideradas como un producto *gourmet*. En efecto, forman parte de los platos más representativos de países como Francia o India, gracias a su gran versatilidad, dándoles un sabor peculiar, entre amargo, picante, ácido y salado, muy apreciado en recetas de todo tipo: para dar sabor y aromatizar salsas (como la salsa tártara), mayonesas, pastas, ensaladas, pizzas, aperitivos, carnes estofadas, y guisos, entre otros. Las alcaparras son la base de platos como la “salsa tártara” que acompaña al “*steak tartar*”, del salmón ahumado, la “hallaca” plato típico navideño en Venezuela o el “ajiaco santafereño” en Colombia.

La principal forma de consumo de la alcaparra en España es encurtida, ya sea sola o acompañada de otros alimentos, como las aceitunas, pepinillos y cebolletas, entre otros. Según el Real Decreto 2484/1967 de 21 de septiembre (BOE 17/10/67), por el que se aprueba el texto del Código Alimentario Español, dentro de las distintas formas de conservación de los alimentos, en el capítulo V, se define como encurtido (donde se incluirá a la alcaparra), a los alimentos que tras ser tratados con salmuera o que han sufrido una fermentación láctica, son sometidos a la acción del vinagre, con o sin adición de sal, azúcares o condimentos.

De *C. spinosa* (L.) se consumen:

- ✓ Los botones florales, o flor cerrada (alcaparras), son la parte de la planta más aprovechada en alimentación y, tal vez, el aprovechamiento industrial más importante en gastronomía. En cocina se suelen utilizar preparados en salmuera o vinagre, como

aperitivo (“alcaparrado” a base de aceitunas enteras o deshuesadas, generalmente de pequeño tamaño, con alcaparras y con material de relleno o sin él, envasados con otros productos alimenticios -BOE 304, 2016-), aderezo de ensaladas, ingrediente de salsas (salsa tártara), platos de carne y muchos otros platos de cocina. En la industria agroalimentaria se utiliza el botón floral, habitualmente de hasta ocho milímetros de diámetro (Fotografía 1.6.1)

- ✓ Los frutos tiernos (alcaparrones) se usan en la cocina de igual forma que las alcaparras, es decir, se suelen conservar en vinagre o salmuera y se usan como aperitivos o condimentos de ensaladas y otros platos (Fotografía 1.6.1 a).
- ✓ El tallo tierno también se usa en la cocina de algunas regiones, preparado en salmuera o vinagre, como aperitivo o condimento. Las hojas de alcaparra secas se utilizan como un sustituto para el cuaje en la fabricación de queso de alta calidad.

Otras partes de las plantas de *Capparis*, como las hojas y las raíces, también se usan en medicina, aunque generalmente no se consumen en alimentación. Existe una larga historia de venta de estas partes tanto en dietética como en los fármacos vegetales en todo el mundo.



Fotografía 1.6.1. Tarros comerciales de alcaparras y alcaparrones encurtidos (a) y alcaparras deshidratadas y presentadas en forma de polvo (b). Etiqueta comercial de “Alcaparra de Ballobar” (Huesca) (c).

Las plantas que crecen en condiciones desérticas concentran metabolitos que hacen que estas plantas sean potencialmente venenosas para los animales como las cabras (García *et al.*, 2008; Costa *et al.*, 2011) y ovejas (Fotografía 1.6.2). Esto hace que las plantas de alcaparra no sean el alimento preferido de las cabras y cuando forman parte de una dieta regular de los rumiantes pueden causarles debilidad de las extremidades posteriores (Ahmed *et al.*, 1981; 1993). Sin embargo, durante el período de abundancia de botones florales y frutos, *Capparis* spp. es un alimento apreciado por algunos monos (Cunningham y Janson, 2007).



Fotografía 1.6.2. Manada de ovejas y cabras pastando en un campo de cereales. Las alcaparras se desarrollan sin ser comidas a pesar de su llamativo color verde.

1.6.2.2. Uso ornamental

La planta tiene un gran valor ornamental por su belleza (Fotografía 1.6.3). El follaje de alcaparras es atractivo, pero las flores, muy vistosas, con pétalos blancos y rosáceos, emanan un delicado perfume característico que dan a la alcaparra la mayor parte de su valor ornamental (Bailey, 1927; Baccaro, 1978; Foster y Loudon, 1980), hasta el punto, que algunos las llaman las “orquídeas del Mediterráneo”. Las bajas exigencias hídricas y edáficas de la alcaparra, hacen que sea una planta ideal para su uso en plantaciones ornamentales, para terrazas expuestas al sol, bordes, jardines rocosos y muros (Coutanceau, 1957).



Fotografía 1.6.3. Flor de alcaparra mostrando la amplia gama cromática de sus órganos.

La belleza de la alcaparra ha sido transformada en joyas, fruto del protagonismo de la artesanía (Fotografía 1.6.4) y la nostalgia, por el profesor y jefe del departamento de Joyería de la Escuela Superior de Disseny de les Illes Balears, Damià Mulet. Este joyero de Campos, municipio mallorquín conocido desde antaño por la calidad de sus alcaparras, ha resucitado este cultivo en forma de souvenirs exclusivos, como pendientes, anillos, pulseras, agujas de corbata, gemelos y colgantes, en plata y oro (Fotografías 1.6.5).



Fotografía 1.6.4. Escultura que representado los botones florales de la alcaparra en Campos (Mallorca). Diseño del joyero Damià Mulet.



Fotografía 1.6.5. Algunas de las joyas, en oro y plata, de la colección *Capparis spinosa* realizadas por el joyero Damia Mulet en Campos (Mallorca).

1.6.2.3. Uso medicinal y cosmético

La importancia de *Capparis* spp. como fuente de fitoquímicos valiosos, con aplicaciones medicinales, no ha pasado desapercibida, tanto en los anales de la antigüedad, bien conocida por los antiguos griegos y romanos como en modernos estudios e investigación. Las alcaparras se usaron en la antigua Grecia como carminativas y la fitomedicina tradicional ha usado la alcaparra durante siglos por sus actividades antifúngicas, antiinflamatorias, antidiabéticas y antihiperlipidémicas (Tesoriere *et al.*, 2007). La mayoría de los órganos de la planta de alcaparras han sido ampliamente utilizados como remedios populares para diversas enfermedades (Pernet, 1972, Kirtikar y Basu, 1975, Boulos, 1983, Duke, 1983, Jain y Puri, 1984, Abbas *et al.*, 1992; Husain *et al.*, 1992; Al-Said, 1993, Ghazanfar y Al.Sabahi, 1993, Ghazanfar, 1994, Bhattacharjee, 1998). Los estudios recientes parecen confirmar algunas afirmaciones de estas formulaciones tradicionales (Suja *et al.*, 1997; Vijaya Padma *et al.*, 1998; Sandhir y Gill, 1999; Dhawan y Goel, 1994; 1994; Gopumadhavan *et al.*, 1993; Chauhan *et al.*, 1994; Sandhir y Gill, 1999; Fleig *et al.*, 1997; Shirwaikar *et al.*, 1996; Gadgoli y Mishra 1995, 1999; Thabrew *et al.*, 1982; Katarina y Singh 1997; Roy *et al.*, 1994; Mathur, 1994, Rathore y Varghese, 1994; Singh *et al.*, 1983).

El género *Capparis* como resultado de su evolución química durante milenios ha desarrollado fitoquímicos para sus propias necesidades botánicas de defensa, atrayendo a los polinizadores y avanzando su migración en todo el mundo. Estos mismos fitoquímicos son útiles para sanar y corregir nuestros propios desequilibrios y desventajas, infecciones, calmando nuestros nervios, deteniendo nuestras convulsiones, derritiendo nuestros cánceres, limpiando nuestros corazones y sistemas circulatorios, corrigiendo nuestro metabolismo del azúcar, balanceando nuestro peso (Lansky *et al.*, 2014).

Hoy en día, las plantas medicinales tienen un papel importante en la dieta de las personas. La mayor resistencia resultante del uso excesivo de

antibióticos sintéticos químicos, la búsqueda de medicinas alternativas que tengan propiedades antibacterianas y los menores efectos secundarios sobre la salud humana parece ser necesaria. Una valiosa fuente de una amplia gama de metabolitos secundarios, que se utilizan como productos farmacéuticos, agroquímicos, sabores, fragancias, colores, bio pesticidas y aditivos alimentarios (Rahnavard y Razavi, 2016). Según la Organización Mundial de la Salud (OMS), más del 80% de la población mundial, en su mayoría en países pobres y menos desarrollados, dependen de las medicinas tradicionales basadas en plantas para sus necesidades de atención primaria. Estas plantas son ampliamente utilizadas por todos los sectores de la sociedad, ya sea directamente como remedios populares o indirectamente como la preparación farmacéutica de la medicina moderna (Rajesh *et al.*, 2009).

Capparis spinosa L. es una planta medicinal con una amplia gama de actividades farmacológicas que podrían ser utilizadas en varias aplicaciones médicas. La alcaparra contiene muchos químicos biológicamente activos como los alcaloides, Glucósidos, taninos, fenoles, flavonoides, triterpenoides, esteroides, carbohidratos, saponinas y una amplia gama de minerales y oligoelementos (Rahnavard y Razavi, 2016).

Las alcaparras que son descartadas para usos gastronómicos por su forma o tamaño, pueden ser aprovechables en la cosmética, elaboración de productos nutracéuticos o en productos farmacéuticos. *C. spinosa* es ampliamente utilizada en la medicina tradicional local para el tratamiento de muchos trastornos (Mohammed *et al.*, 2015; Singh y Singh, 2011; Singh *et al.*, 2011; Tlili *et al.*, 2011). Entre sus muchas cualidades es diurética (la raíz y la corteza provocan la diuresis), antidiabético (tiene un efecto hipoglucemiante, inhibe la producción de glucosa hepática y mejora la captación de glucosa por los tejidos periféricos), analgésica, antihipertensiva, antihemorroidal, carminativa, depurativa, antiesclerosis, vasoconstrictora, estimulante y astringente. También ayuda a controlar enfermedades inflamatorias y reumáticas (artrosis y artritis) dado que tiene un gran poder antiinflamatorio y antioxidante, debido a la presencia de carotenoides flavonoides como la quercetina y el kaempferol (Camacho,

2012; Ameer, 2014; Lo Bosco, 2017). Las hojas y la corteza de las ramas pueden tener cierta actividad anticancerígena (Hartwell 1668, Khan *et al.*, 1992; Rosa *et al.*, 1997; Dragsted, 1999; Rizk, 1986; Rosa *et al.* 1997; Miller 1996; Pietta *et al.*, 1996; Herrero Latorre *et al.*, 1987). La rutina (o rutrósido) y la quercetina pueden contribuir a la prevención del cáncer (Committee on Comparative Toxicity *et al.*, 1996). También tiene propiedades antivirales, antibacterianas y antimicrobianas empleándose en el tratamiento de infecciones fúngicas y leishmaniasis. La corteza de la raíz, mascada antes de las comidas, aumenta el apetito. En la industria cosmética se ha utilizado en la prevención de la alopecia para mejorar la función capilar y la piel seca, y en tratamientos de afecciones cutáneas como son las pomadas cicatrizantes. Las semillas se han utilizado contra la esterilidad femenina y la dismenorrea y para aliviar el dolor de muelas, también para combatir úlceras y escrófulas (proceso infeccioso que afecta a los ganglios; (Rahnavard y Razavi, 2016). Además, se ha demostrado la presencia (en concentraciones significativas) de compuestos fenólicos, α - y γ -tocoferoles y unos niveles considerables de vitamina C que demuestran el valor nutricional y antioxidante de la alcaparra (Tlili *et al.*, 2010).

La aplicación tópica puede causar dermatitis (Lansky *et al.*, 2014). Las partes verdes de la planta se han considerado potencialmente irritantes para la piel debido a sus glucosinolatos (Mitchell, 1974, Mitychell y Rook, 1979, Cronin 1980, Foussereau *et al.*, 1982). Barbera (1991) sugirió que podrían utilizarse para preparaciones cosméticas (cremas, champú, lociones y geles).

1.6.2.4. Valor ecológico y ambiental

Los miembros de la Asociación Ecológica de los Monegros (Aragón) ha conseguido recuperar este cultivo, que además está muy adaptado a las especiales condiciones climáticas.

La alcaparra tiene una alta adaptabilidad a los campos agrícolas marginales que no son adecuados para otros cultivos agrícolas. Otra alternativa es el aprovechamiento de la capacidad de la planta para fijar el suelo para reducir el riesgo, potencial o real, de erosión (Reche, 1967; Lozano 1977). Andreu *et al.* (1994) encontraron que el mejor control de la escorrentía era la vegetación arbórea natural y las plantas de alcaparra podrían ser adecuadas para plantaciones de control de la erosión. Las plantas de alcaparra adultas estabilizan el suelo al desarrollar grandes sistemas extensivos de raíces que penetran profundamente, reduciendo la erosión del suelo en paisajes rocosos y escarpados y preservan las reservas de agua en el suelo (Carra *et al.*, 2012). Su propiedad ignífuga puede desempeñar un papel vital en la prevención de incendios forestales (Neyisçi, 1987), y su adaptabilidad a zonas áridas le permite combatir la desertización, generar una fuente de trabajo en zonas marginales y ampliar los territorios cultivables. En este sentido la alcaparra tiene una influencia favorable en el medio ambiente, estabilizando las laderas erosionadas, ayudando a prevenir incendios forestales y beneficiando a algunas economías rurales, por lo que debería estar ligado a políticas ecológicas y medioambientales (Costa y Rossi, 2005).

En definitiva, la alcaparra es una planta con gran resistencia a la sequía, que a su vez sirve de protección de la tierra frente de erosiones, siendo una alternativa que interesa ser estudiada sobre todo por las previsiones de cambio climático (Pérez, 2008). La alcaparra es un cultivo que, si se promoviera adecuadamente, podría contribuir más al desarrollo de las zonas locales.

1.7. IMPORTANCIA ECONÓMICA

En la actualidad, para que el cultivo de la alcaparra sea rentable, es necesario definir los gustos y la calidad de la demanda, para desarrollar un producto diferenciado asegurando producciones de alta calidad. Este mercado de productos diferenciados es de pequeños volúmenes, pero se obtienen precios muy superiores a la media del mercado (Costa y Rosssi, 2005).

El cultivo de la alcaparra puede tener un enorme potencial si se orienta la producción hacia un nicho de consumidores selectivos, comercios de *gourmet*, sin olvidarse de los comercios mayoristas y la industria farmacológica para las alcaparras que no tengan la calidad requerida por este tipo de consumidores.

Tradicionalmente se han cosechado los botones florales de plantas silvestres, pero el interés económico que despertó su precio, hizo que se empezaran a desarrollar plantaciones, principalmente desde la década pasada de los 70.

Resulta atractivo que la demanda internacional sea superior a la oferta, debido a los problemas que tienen los principales países productores, Turquía y Marruecos, en la reproducción de las plantas. En España e Italia las plantaciones de alcaparra han sido sustituidas por otros cultivos que requieran menos mano de obra. Esta situación impide el incremento de la superficie dedicada a su cultivo.

1.7.1. Producción mundial

Las principales zonas productoras se encuentran en los ambientes más desérticos de Marruecos, Península Ibérica, Turquía y las islas italianas de Pantelleria y Salina.

En España hasta los años 80, existía un auge de la superficie de cultivo destinada a la producción de la alcaparra. Posteriormente y hasta la actualidad, este valor ha disminuido progresivamente al ser sustituido por otros cultivos de mayor rendimiento económico y con menos necesidades de mano de obra. Según el Anuario de Estadísticas del Ministerio de Agricultura y Pesca, Alimentación y Medio Ambiente (MAPAMA, 2017), la superficie destinada al cultivo de la alcaparra disminuyó vertiginosamente desde el año 1985 hasta el año 2013, último dato disponible, pasando de casi 4.000 ha a tan sólo 75 ha en 2013 (Figura 1.7.1) en todo el territorio español, fundamentalmente en Andalucía, Murcia y una pequeña superficie en Baleares.

La producción también descendió bruscamente, pasando de las $5 \cdot 10^6$ kg en el año 1985 a $0,35 \cdot 10^6$ kg en 2013, constatándose, un mayor rendimiento por hectárea, al cultivarse de forma más regular (Figura 1.7.1).

Pese a la decadencia del cultivo en España, algunas empresas españolas siguen como referentes en su comercialización mundial, aunque deben recurrir, para mantener dicha primacía, a materia prima importada. Existe en Águilas (Murcia) una empresa (Agrucapers SA) que es líder mundial desde 2011, al controlar entre el 20 y el 25 % de la producción internacional de alcaparras y alcaparrones (aproximadamente $4 \cdot 10^6$ kg, comercializando en 62 países (Agencia EFE, 2011). El precio recibido por los suministradores oscila entre 1 €/kg para los botones florales grandes y 3,6 €/kg para los botones florales pequeños.

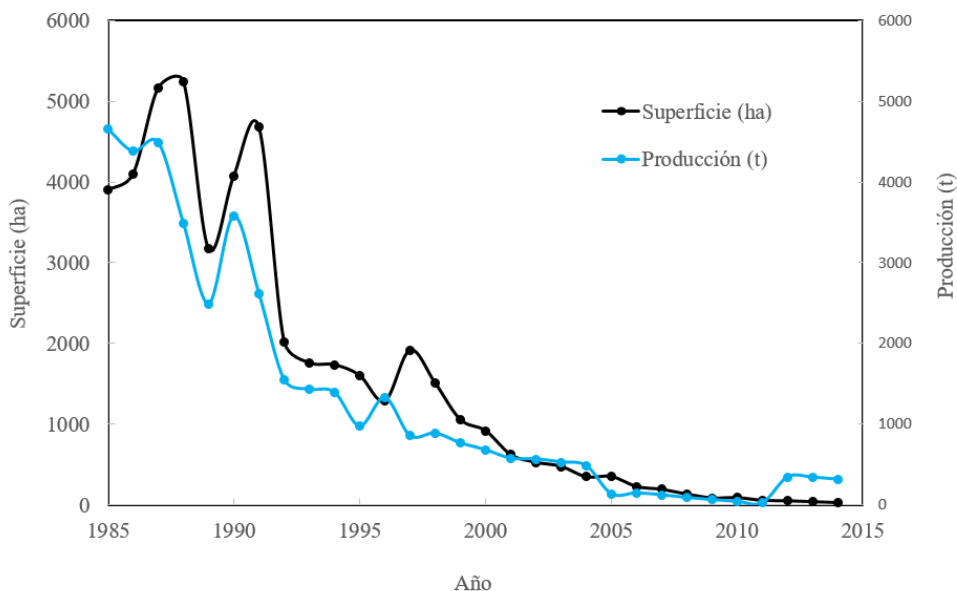


Figura 1.7.1. Evolución de la superficie (ha) y producción (t) de alcaparras en España en el periodo 1985-2014 (MAPAMA, 2017).

A partir de 1977/78, España tuvo un rápido crecimiento en las áreas de cultivo de alcaparras y su producción alcanzó el primer lugar mundial en pocos años. El área de producción de alcaparras más importante desde 1978 hasta 1991, con una producción media de 3550 t/año y un máximo de 4685 t en 1985 (Fig. 4.1), se extendía por las provincias de Almería, Murcia, Islas Baleares, Jaén, Granada y Córdoba, y Valencia. El éxito del cultivo de la alcaparra en estos años se debió a la disponibilidad de semillas y plantas, de suelo y climas favorables, la posibilidad de utilizar suelos de bajo rendimiento, sus rápidos ingresos y sus elevadas rentas, la baja inversión inicial, los bajos costos de producción y la crisis de cultivos tradicionales, como la del olivo en Andalucía.

Italia a pesar de la cultura del consumo de alcaparras, al igual que en España, entre 1960 y 1985 se produjo un aumento de la producción de alcaparras. El 95 % de las alcaparras italianas se producen en áreas insulares sicilianas, concretamente la Isla de Pantelleria y la Isla Salina y, en menor medida las islas de Lipari y Filicudi (Barbera, 1991) donde se ha convertido en un importante cultivo económico. En los últimos años, la alcaparra cultivada en Pantelleria obtuvo la denominación europea de Indicación Geográfica Protegida (IGP) que reconoce la calidad y, por tanto, el valor económico de las variedades regionales de alcaparra (Carra *et al.*, 2012). Este aumento de producción hasta la década de los 80 fue debido a la recesión de cultivos tradicionales como la viña y el olivo, a la creciente demanda interna de alcaparras, que proporcionaba un mayor margen de beneficio, a la mejora de las técnicas culturales y de los procedimientos de conservación temprana, a la creación de asociaciones y a la mejora en los niveles socioeconómicos (Caccetta, 1985; Barbera y Butera, 1992).

Turquía ha llegado a ser el principal país exportador de alcaparras, procedentes de plantas silvestres recolectadas en la mayoría de zonas del país. Sin embargo, en los últimos años han empezado a cultivarse en plantaciones regulares. La mayor parte de la producción turca de alcaparras procede, fundamentalmente, de las provincias de la costa del mar Egeo y del Mediterráneo. El resto de la producción se obtiene en algunas zonas cálidas y de otras zonas del noreste y sureste del país.

Marruecos es un importante país exportador de alcaparras fundamentalmente a países europeos como Italia, Francia, Alemania y Suiza, además de Estados Unidos (Anon, 1982). La producción se basa principalmente en plantas silvestres, espinosas, de diferentes especies estrechamente relacionadas, que no se procesan adecuadamente. Esto hace que la calidad del producto marroquí no se considere excepcional, aunque en los últimos años se ha conseguido la estabilización de los beneficios y la mejora de la producción y la calidad de las alcaparras. Las regiones tradicionalmente productoras son Fez, Taounate, Boulemane, y al suroeste

de Marrakech. El consumo local es insignificante, ya que las alcaparras no suelen utilizarse en la cocina tradicional marroquí.

La mayoría de la producción de alcaparras de Túnez procede de los especímenes silvestres sin espinas que crecen en la región montañosa situada al norte y al noreste de Túnez (Barbera, 1991). La producción de Israel no ha parado de disminuir desde la década de los 70 (Putievsky, 1977).

En Francia, todavía se cultiva en los departamentos de los Alpes Marítimos, Var y Bouches-du-Rhône. En otros países alrededor de la cuenca mediterránea, como Grecia y Chipre se llevan a cabo recolecciones ocasionales de plantas silvestres.

La alcaparra era un cultivo prometedor en los Estados Unidos, concretamente para la plantación de laderas en California, pero fue imposible su extensión hasta fechas recientes (Stromme, 1988). En Argentina, actualmente se cultivan varias especies del género *Capparis* en pequeñas plantaciones que suministran al comercio local (Gómez 1953).

1.7.2. Comercio exterior

Un obstáculo importante para un análisis satisfactorio del comercio de las alcaparras, como es el caso de muchas otras especies, es la falta de información estadística verosímil. El intercambio comercial de alcaparras involucra a más de 60 países y en la mayoría de ellos se carecen de cifras precisas de producción. Por otra parte, las estadísticas de exportación e importación no incluyen las alcaparras que se comercializan en otros productos elaborados, con pérdidas de identidad (G. Chironi, en Barbera, 1991; Sozzi, 2000). Las estadísticas comerciales son la única fuente de información sobre el consumo en muchas regiones de Europa, donde las alcaparras se producen a menudo para uso local o incluso doméstico.

Por otro lado, Países como España siguen manteniendo su liderazgo en los mercados internacionales de alcaparra de calidad, a pesar de haber reducido su producción considerablemente. España importa grandes cantidades de alcaparras a granel, en salmuera u otros conservantes, de países como Marruecos, Turquía, Argelia y Túnez y las destina al abastecimiento de sus clientes extranjeros. Tras su reelaboración y envasado en pequeños envases utilizando en muchas ocasiones la marca del importador, las exporta a países principalmente europeos y del continente americano como EEUU, Méjico, Venezuela, República Dominicana, entre otros. Los precios ofertados por los principales países productores, caracterizados por una mano de obra barata y recolección de plantas silvestres, impiden que los precios del mercado aumenten a un ritmo mayor. En España, los precios medios percibidos por el agricultor no han superado los 2,5 € kg⁻¹ (MAPAMA, 2017), sin embargo, las producciones destinadas a productos tipo gourmet pueden llegar a triplicar estos precios.

Los calibres más pequeños (mayor calidad) se destinan fundamentalmente a satisfacer las necesidades de los países europeos y los calibres más grandes suelen destinarse al continente americano, aunque cada vez exigen mayor calidad. Esto pone de manifiesto que el mercado internacional, cada vez exige mayor cantidad de calibres pequeños.

El principal productor y exportador de alcaparra a granel en el mundo es Marruecos con 4700 t año⁻¹. El segundo lugar lo ocupa Turquía, que ha incrementado sus exportaciones en los últimos años y sigue muy de cerca a Marruecos. Otros países exportadores Siria y Túnez. Entre los principales países importadores está España, que importa entre 300 y 400 t año⁻¹, EEUU, que importa 2000 t año⁻¹, e Italia que importa 4 t año⁻¹ (MAPAMA, 2017).

Basándose en las estadísticas de importaciones de alcaparras de Estados Unidos se puede constatar que se están consumiendo cantidades cada vez mayores de alcaparras. Por otra parte, la producción española e italiana ha estado cada vez más expuesta a la influencia competitiva internacional de Turquía y Marruecos. Por otro lado, la calidad y la presentación de las alcaparras españolas, italianas, griegas y francesas, son reconocidas por los comerciantes y se pagan precios más altos. De hecho,

productores griegos y franceses, generalmente obtienen los mejores precios al comercializar cantidades muy pequeñas que son compradas por los comerciantes interesados en asegurar un suministro de alta calidad.

El comercio de la alcaparra es muy dinámico, con las importaciones y las exportaciones subsecuentes combinadas a menudo. Los principales mercados de Turquía para las exportaciones de alcaparras son España, Estados Unidos, Francia, Italia, Alemania, Países Bajos, Brasil, Reino Unido, Bélgica, Venezuela, Japón, Dinamarca e Israel. Dinamarca no produce alcaparras, pero exporta mayores cantidades a Estados Unidos que Italia. Y Estados Unidos, cuya producción es insignificante, exporta parte de sus importaciones a otros países, por ejemplo, Venezuela. Marruecos también exporta alcaparras a España e Italia, productores tradicionales que dedican gran parte de su producción a la exportación.

1.7.3. Comercio nacional

Hace unas décadas, este cultivo formaba parte de la economía local de muchas partes del litoral Mediterráneo en España, donde los agricultores recolectaban las partes comestibles y las vendían por peso, en función de su tamaño. En cambio, en la década de los 90, este cultivo casi desapareció de la economía local por varios motivos, porque las condiciones laborales eran duras ya que la recolección de los productos se hace en verano y es una tarea muy exigente. Por otro lado, no se podía competir con los precios que imponía el mercado marroquí debido a su barata mano de obra. Por último, la aparición de otros cultivos más competitivos, y la aparición de otros sectores más potentes, como el turismo.

Según el MAPAMA (2017), la superficie de plantación regular cayó un 89 % entre 1999 y 2009, pasando de 4.487 hectáreas a 501 ha. Así, la cosecha también descendió en un 92 % en ese periodo (de $765 * 10^3$ kg a $61 * 10^3$ kg), mientras que su valor de mercado lo hizo en un 92 % (de 1,53 millones de euros a tan solo 123.000 euros en 2009) (Figura 1.7.2).

En las últimas décadas se están potenciando los productos a base de alcaparras de alta calidad amparados con la inscripción de las “Tàperes Mallorquines/ tàpera de Mallorca” en el catálogo de alimentos tradicionales de las Illes Balears (número de expediente de inscripción, 1 a).

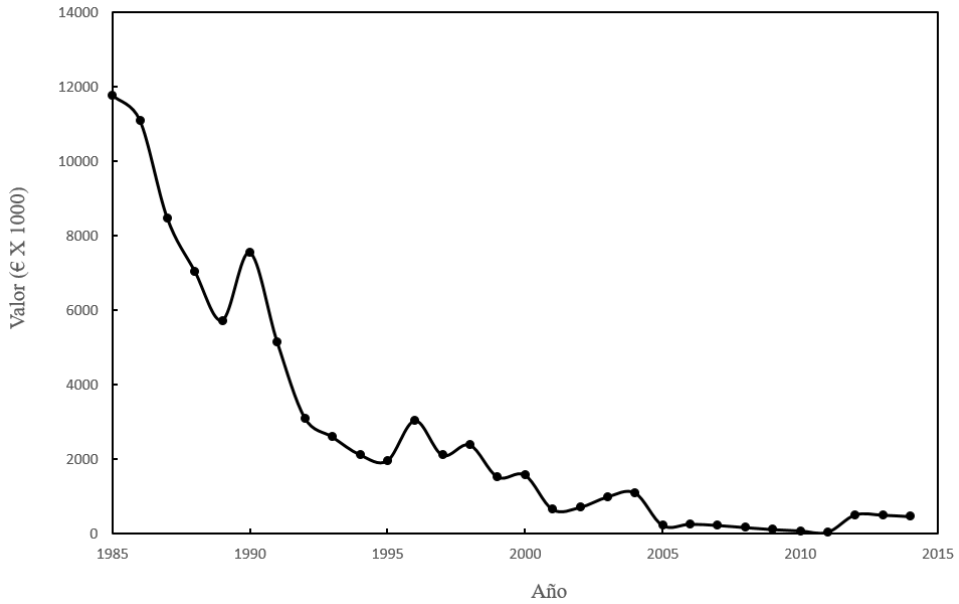


Figura 1.7.2. Evolución del valor (€ x 10³) de las alcaparras en España en el periodo 1985-2014 (MAPAMA, 2017).

1.8. OBJETIVOS GENERALES

1.8.1. Antecedentes

La presente tesis doctoral se realiza dentro de la línea de investigación de mejora de la propagación de la alcaparra, desarrollada en el departamento de Producción Vegetal de la Universitat Politècnica de València. Fruto de esta línea de investigación se han publicado varios artículos sobre la propagación, sexual y vegetativa, de esta planta, en los que se analizan entre otros: la influencia de la posición del fruto en la planta madre, el peso del fruto y su madurez sobre la germinación (Pascual *et al.*, 2003); la aplicación de diversos tratamientos para superar las posibles latencias física y fisiológica (Pascual *et al.*, 2004; 2009); la utilización de los frutos enteros como órgano de propagación (Pascual *et al.* 2006 a); la pérdida de la viabilidad y del poder germinativo de las semillas tras ser almacenadas durante 4 años (Pascual *et al.* 2006 b); la influencia de la fecha y de la sección de las ramas en el enraizamiento y la brotación de las estaquillas (San Bautista *et al.*, 2006); el enraizamiento de estaquillas de madera suave (Pascual *et al.*, 2008).

1.8.2. Objetivos

El objetivo general de esta tesis doctoral es establecer las pautas para la obtención de una propagación viable de *C. spinosa*, a través de las técnicas utilizadas habitualmente en los viveros, dado que ya está comprobada la viabilidad de la micropropagación de la misma.

En cuanto a la propagación sexual se incidirá en los aspectos que han sido menos estudiados hasta la fecha, como la viabilidad y el deterioro de las semillas durante el almacenamiento, la imbibición, necesaria para la

germinación de las semillas, y que potencialmente podría ser la causa de los bajos porcentajes de germinación, el efecto de dos métodos de escarificación, y de la estratificación sobre la viabilidad y germinación de las semillas.

En el apartado de la propagación vegetativa se estudiará la influencia de las características de las estaquillas utilizadas, grado de lignificación, diámetro y posición en la rama de donde se obtiene la estaquilla, en el prendimiento de las mismas, así como la utilización de diversas técnicas con el objetivo de mejorar el prendimiento.

2. PROPAGACIÓN SEXUAL

2.1. INTRODUCCIÓN

2.1.1. La semilla

La semilla es la unidad de diseminación y reproducción de las plantas superiores; desde el punto de vista botánico la semilla es un óvulo maduro, encerrado dentro de un fruto u ovario.

La estructura básica de las semillas de las angiospermas consta de embrión, tejidos de reserva o reservas nutritivas, y cubiertas. El embrión consiste en un eje embrionario y el o los cotiledones, cuya inserción divide en dos partes al eje embrionario: epicótilo e hipocótilo. En la actualidad se distinguen varios tipos de embriones, según una clasificación establecida en 1947 por Martín (Besnier, 1989; Finch-Savage y Leubner-Metzger, 2006), basada en la morfología de los mismos [tamaño relativo del embrión respecto al total de la semilla, posición (basal, periférica o axial), y curvatura]: rudimentario, ancho, capitado, lineal, periférico, espatulado, axial en miniatura, curvado, plegado, e investido.

Los tejidos de reserva o sustancias nutritivas se encuentran fundamentalmente en el endospermo y en los cotiledones, y en algunos casos en el perispermo. Según el contenido relativo de los tres grandes componentes de las reservas nutritivas, se distinguen tres tipos de semillas: amiláceas, proteaginosas y oleaginosas.

La cubierta de la semilla procede del desarrollo de los tegumentos del óvulo y constituye la protección de las semillas; puede estar formada por la testa, o por la testa y el tegmen, denominándose bitégmicas a las semillas que poseen testa y tegmen. En la superficie de la testa pueden observarse todas o algunas de las siguientes estructuras, más o menos diferenciadas (Besnier, 1989): (i) Hilo: es la cicatriz dejada por el desprendimiento del funículo del óvulo, al secarse la semilla. (ii) Micrópilo: es un orificio puntiforme que corresponde al micrópilo del óvulo. En óvulos anátropos y

campilótrpos está junto al hilo. (iii) Chalaza: es una protuberancia que corresponde al lugar donde estaba la chalaza del óvulo.

2.1.2. El proceso de la germinación

Se denomina germinación al proceso de reactivación de la maquinaria metabólica de la semilla y la emergencia de la radícula y de la plúmula, conducentes a la producción de una plántula (Hartmann y Kester, 1990). Para que la germinación se inicie, se necesitan 3 condiciones: (i) la semilla debe ser viable, es decir, el embrión debe estar vivo; (ii) la semilla no debe estar latente; (iii) las condiciones ambientales deben ser apropiadas (agua, temperatura, oxígeno y luz, en su caso).

Desde el punto de vista fisiológico la germinación comienza con el inicio de la reactivación bioquímica y termina con la emergencia de la radícula, pero desde el punto de vista morfológico, la definición incluye la formación de una plántula normal. Desde esta perspectiva en el proceso de la germinación pueden distinguirse dos fases, que incluyen respectivamente la iniciación de la germinación (finaliza al emitir la radícula), y la movilización de las reservas (finaliza con la nascencia) y el crecimiento de la plántula.

La primera fase de la germinación comienza con la imbibición o absorción de agua. La semilla seca absorbe agua y el contenido de humedad al principio aumenta rápidamente, estabilizándose después; al final, de nuevo se incrementa el contenido de agua, lo que está relacionado con el alargamiento de las células y la aparición de la radícula. Es el denominado modelo trifásico de absorción (Hatmann *et al.*, 2014).

La imbibición se produce por la diferencia de potencial hídrico entre la semilla y el sustrato, siendo el agua absorbida por los coloides de la semilla. Es un fenómeno físico, por lo que se produce también en semillas

latentes y en semillas muertas. Las proteínas son los componentes de las semillas más importantes en la absorción de agua.

La hidratación no es uniforme en toda la semilla, iniciándose la actividad en las zonas hidratadas en primer lugar. Si una vez iniciada la hidratación se produce una desecación, pueden producirse daños en la semilla, sobre todo si el embrión ya está hidratado; no obstante, existe un tiempo, variable con las especies, en que la semilla puede desecarse sin que la germinación se vea afectada al ser rehidratada. Las semillas tratadas con polietilenglicol $[\text{HO}-(\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{O})_n-\text{H}]$ se hidratan parcialmente (por el potencial osmótico); si estas semillas se secan superficialmente y después se hidratan con agua, se obtiene una aceleración en la aparición de la radícula y una mayor uniformidad en la germinación.

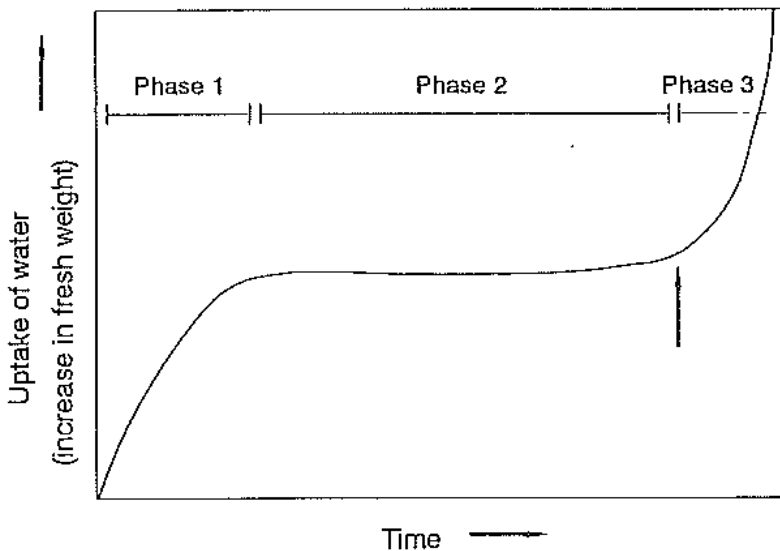


Figura 2.1.1. Modelo trifásico de absorción de agua de las semillas durante el proceso de germinación. La flecha indica el momento de la emergencia de la radícula. De Bewley y Black (1994).

Inicialmente el ritmo de la respiración de las semillas secas es muy bajo, aumentando con la imbibición. Al igual que en la imbibición, en el ritmo de la respiración pueden distinguirse tres fases. Después de una primera fase de absorción rápida de oxígeno, existe una segunda fase en la que domina la respiración anaerobia; cuando la radícula rompe la testa, entra libremente el oxígeno y aumenta rápidamente su consumo.

Las enzimas y las hormonas conservadas en el eje embrionario de las semillas secas se activan con la imbibición, e inician los procesos metabólicos a expensas de las reservas almacenadas en el propio eje embrionario. Gran parte de la actividad metabólica inicial está destinada a la reparación de membranas (de las mitocondrias, del retículo endoplasmático y del aparato de Golgi) que han sido dañadas como consecuencia de la desecación. En la actualidad se piensa que la pérdida de viabilidad de las semillas secas, se debe principalmente a la incapacidad de realizar estas reparaciones.



Fotografía 2.1.1. Final de la primera fase de la germinación de las semillas de *C. spinosa*: rotura de la cubierta.

El alargamiento de la radícula, que se produce, en la mayoría de los casos, debido al alargamiento de las células y no a la división celular, necesita de la síntesis de proteínas, que ocurre poco después de comenzar la imbibición. Con la rotura de las cubiertas por parte de la radícula (se finaliza la primera fase de la germinación; Fotografía 2.1.1), se provoca la entrada libre de oxígeno, la activación de la respiración y el aumento del aporte de energía; se agotan las hormonas y enzimas de reserva, sintetizándose otras hormonas y enzimas y se movilizan las reservas almacenadas en los tejidos de almacenamiento, iniciándose la segunda fase de la germinación, con el crecimiento activo de la plántula por multiplicación celular (Fotografía 2.2.2).



Fotografía 2.1.2. Segunda fase de la germinación de las semillas de *C. spinosa*: emergencia de la radícula y crecimiento del hipocótilo.

El inicio de la actividad metabólica es posible porque las semillas secas conservan sustratos, enzimas y hormonas. Las semillas secas conservan los ribosomas, el ADN cromosómico, el ARN de transferencia, el ARN mensajero, las polimerasas y sintetetas del ARN, pero en cambio es dudosa la presencia, o al menos la eficacia, del ARN ribosómico. Parece que la iniciación de la germinación resulta de la activación de moléculas específicas de ARN mensajero controladoras de la germinación, en las cuales la información para ello fue *transcrita* durante el desarrollo de la

semilla, pero la *traducción* se pospone hasta la imbibición de agua por la misma. La acción del ARN mensajero dura poco, necesitándose para la continuidad de la germinación la nueva síntesis de ARNm, ARNt, ARNr y de ADN, realizándose la síntesis de este último con retraso respecto a las de los ARN. Probablemente la principal causa del retraso en la síntesis de ADN es que se han de reparar los daños que se han producido (roturas cromosómicas, mutaciones o cambios en las bases nitrogenadas) durante el secado. Las reparaciones para cambiar las bases alteradas se hacen por medio de enzimas.

En las semillas secas, especialmente en los ejes embrionarios, se conservan enzimas de varios tipos, con distintas formas de iniciación de su actividad, siendo la imbibición un requisito indispensable para que se inicie la misma. Al activarse, determinadas enzimas liberan de sus ligamentos a las GAs conservadas en la semilla seca.

Se admite que las hormonas son agentes desencadenantes de la germinación, pero realmente se conoce poco de su forma de actuación. Las principales hormonas que intervienen en los procesos fisiológicos que tienen lugar en la germinación son GAs, CKs y abcisinas, aunque también actúan las auxinas y el etileno.

En las semillas secas se han encontrado diversas clases de GAs, siendo probablemente GA₁ y GA₄ las más activas. El contenido en GAs libres disminuye a medida que la semilla madura, de forma que su contenido en la semilla madura es casi nulo, mientras que sí que existen ligadas en forma de glucósidos y de ésteres glucosídicos. Estas formas son hidrosolubles, por lo que son transportadas fácilmente y atraviesan las membranas celulares; la acción de glucosidasas y estereras libera las GAs originales. Las GAs inducen la acción de las enzimas hidrolíticas existentes en la semilla seca y su nueva síntesis, intervienen en el metabolismo de la glucosa, en la respiración y en la síntesis de nuevas proteínas, pero se desconoce la existencia de un patrón general de actuación de las mismas en la fase de iniciación de la germinación.

En muchas semillas maduras se han encontrado citoquininas (CKs; fundamentalmente zeatina y sus derivados). Las CKs forman parte del ARNt, afectan la permeabilidad de las membranas, promueven la síntesis de proteínas, estimulan el alargamiento de la radícula y la expansión de los cotiledones, intervienen en la regulación de los niveles de GAs [en la poáceas permiten la liberación de GAs desde el escutelo a la capa de aleurona (Copeland y McDonald, 1995)] e intervienen en la actividad hidrolítica de las enzimas existentes en los cotiledones.

Probablemente el equilibrio entre GAs, CKs y ABA (inhibidores) determina la continuación o el cese de la latencia. El ABNA es un inhibidor de la expansión celular, de la síntesis y de la acción de diversos enzimas y, en general, de la germinación. En las semillas inmaduras impide la germinación de las mismas; en las semillas maduras latentes, mantiene el letargo, mientras que no desempeña ningún papel en las semillas adultas no latentes. Parece que en la fase de iniciación de la germinación las auxinas únicamente contribuyen al alargamiento celular. El nivel de las auxinas parece que está afectado por el de etileno, que, aunque no existe en las semillas secas se forma a partir de aminoácidos.

Existe la creencia de que los elementos que inician la cadena de acontecimientos que conducen a la germinación son las enzimas conservadas en las semillas secas y no las hormonas; según esta opinión, la abundancia de trabajos de investigación sobre los efectos de las GAs en la germinación se debe a la facilidad de utilizar estas hormonas más que a su mayor importancia relativa. Otras enzimas, inexistentes en las semillas secas, pero imprescindibles para la respiración, la degradación de las reservas y la síntesis de proteínas, se sintetizan mediante ARNm, bien sea del ARNm conservado en las semillas secas, o bien necesiten de la síntesis de nuevo ARNm.

Cuando los mecanismos de respiración, síntesis de proteínas y ácidos nucleicos se han puesto en marcha de modo normal, lo que aproximadamente coincide con la rotura de la testa por parte de la radícula, comienza la segunda fase de la germinación, que engloba la movilización de

reservas y el crecimiento de la plántula. El modelo general de movilización de reservas en la germinación, incluye los metabolismos de los hidratos de carbono, lípidos, proteínas, y de la fitina.

El crecimiento de la plántula comienza con la elongación en los puntos de crecimiento del eje embrionario (plúmula y radícula), seguida de la expansión de las estructuras de la plántula. Cuando comienza el crecimiento del eje embrionario se incrementa el peso (fresco y seco) de la plántula, disminuyendo el peso de las reservas. Al final, las reservas dejan de intervenir en las actividades metabólicas, salvo en los casos en que los cotiledones emergen y se vuelven fotosintéticamente activos.

Con el avance de la germinación se hacen evidentes las estructuras de las plántulas. El embrión es un eje con uno o más cotiledones, en la base del cual está la radícula, y en el extremo superior, está la plúmula. La sección del tallo que está debajo de la inserción de los cotiledones se denomina hipocótilo y la que está por encima, epicótilo.

El patrón de crecimiento de las plántulas es característico de cada familia, género y especie, influyendo en la germinación de las semillas una serie de factores abióticos y bióticos. Existen grandes diferencias en el desarrollo de las plántulas de algunas familias, como las fabáceas y la poáceas. Se distinguen dos tipos de nascencia, según emerjan, o no, los cotiledones, de la superficie del suelo. En la nascencia epigea, el hipocótilo se alarga y eleva los cotiledones sobre la superficie del suelo, mientras que en la hipogea los cotiledones quedan por debajo de la superficie del suelo, emergiendo únicamente el epicótilo. La nascencia epigea es propia de especies (como las fabáceas de ciclo estival) que germinan en climas cálidos, o templados, a finales de primavera y principios de verano, con temperaturas adecuadas para realizar la fotosíntesis. En cambio, la nascencia hipogea es propia de especies (como las fabáceas de ciclo invernal) que germinan en épocas o climas en las que el crecimiento es lento (como en la nascencia otoñal); de esta manera los cotiledones no están sometidos a los accidentes meteorológicos, ni realizan la fotosíntesis, sino que van suministrando sus reservas lentamente a las plántulas.

El crecimiento de las plántulas puede ser afectado por anomalías en la constitución de las semillas, por falta de vigor o por condiciones desfavorables de nascencia. Cuando las anomalías en la constitución son importantes, pueden producirse plántulas anormales, con daños en los cotiledones, en la plúmula, o en la raíz principal, siendo incapaces de vegetar con normalidad; estas plántulas en los ensayos de germinación se consideran como no germinadas. Las principales causas de estas anomalías son deficiencias nutritivas en las plantas madres, deficiente maduración, daños mecánicos en la recolección, daños causados por enfermedades y/o plagas, y daños causados por tratamientos fitosanitarios no adecuados.

Por otra parte, en plántulas normales puede manifestarse falta de vigor. El concepto de vigor es relativo, pues, aunque existen plántulas más vigorosas que otras, en realidad no existen criterios objetivos para determinar de manera absoluta el vigor de un lote de plántulas. Se distingue entre vigor intrínseco y extrínseco.

Se define el vigor intrínseco se define como la capacidad de las semillas para producir, rápida y uniformemente, plántulas normales en condiciones específicas de laboratorio. Depende fundamentalmente de tres condiciones: (i) estado de la maquinaria bioquímica; (ii) cantidad de reserva; (iii) constitución genética. Los posibles trastornos en la formación y en la conservación de los sistemas bioquímicos provocan una alteración en la reactivación de los mismos, y en consecuencia un crecimiento lento e irregular de las plántulas. Cualquier fenómeno que afecte negativamente a los procesos de formación y maduración de las semillas (como las temperaturas desfavorables o la falta de agua) pueden provocar daños (en las membranas celulares, mitocondrias, ribosomas, enzimas y ácidos nucleicos), por lo que es muy importante eliminar las semillas con madurez no adecuada en la limpieza de las semillas comerciales. Con el envejecimiento también pueden producirse alteraciones similares en las semillas bien maduras.

Cuanto más pequeñas son las semillas (para cada especie y variedad) menos reservas contienen, pero además también contienen menos orgánulos subcelulares que intervienen en reacciones bioquímicas (especialmente mitocondrias, que intervienen en la respiración). Por todo ello es importante eliminar las semillas pequeñas en la limpieza de las semillas comerciales.

Dentro de una especie pueden existir variedades que presenten mayor vigor intrínseco que otras, por poseer sistemas bioquímicos más potentes o eficaces; así, por ejemplo, se ha visto que en determinadas variedades híbridas se presentan mayor número y/o actividad de las mitocondrias, mayor contenido en ARNm, o mayor contenido enzimático, que, en las líneas puras, lo que revierte en un mayor vigor intrínseco.

El método más utilizado para medir el vigor intrínseco es el *ensayo topográfico al tetrazolio* (Moore, 1985), en el que los tejidos vivos se colorean de rojo, con distinta intensidad, y que además de utilizarse como test de viabilidad, también puede utilizarse para determinar el valor intrínseco. También pueden utilizarse otros métodos como la medida de la conductividad de los líquidos en que se ha sumergido las semillas (que equivale a medir la cantidad de electrolitos exudados a través de las cubiertas, lo que es un indicio del estado de las membranas celulares), o la medida de la actividad respiratoria (durante las primeras horas de la imbibición), aunque estos métodos no pueden ser utilizados en los métodos oficiales de la ISTA (ISTA, 2007).

Se define el vigor extrínseco como la capacidad de las semillas para producir plántulas normales en condiciones normales de cultivo. En realidad, esta definición obligaría a establecer, para cada especie y región climática, lo que se considera como condiciones normales de cultivo. Existen varios métodos para determinar el vigor extrínseco, basadas fundamentalmente en hacer germinar a las semillas en condiciones desfavorables; los métodos de *ensayo de germinación en frío* y *el ensayo de Hiltner* (Perry, 1984) son probablemente los métodos más utilizados.

2.1.3. La latencia de las semillas

La latencia, letargo o dormancia, de las semillas es una propiedad de las mismas que impide su germinación en condiciones externas adecuadas para que se realice el proceso de la germinación. La latencia está controlada por la estructura intrínseca o por propiedades fisiológicas de la semilla. Es un mecanismo adaptativo; un ejemplo claro es la necesidad de un determinado número de horas de frío que presentan las semillas de muchas plantas silvestres anuales.

Se dice que una semilla viable presenta latencia cuando no germina, en condiciones favorables de humedad, temperatura, concentración de oxígeno, etc., tras la dispersión de la planta madre. La latencia es distinta del reposo; en el reposo no existe desarrollo porque las condiciones ambientales no son favorables para la germinación. En efecto, las semillas de algunas especies como maíz o guisante, que únicamente necesitan de la imbibición para germinar en condiciones ambientales adecuadas, cuando están secas, antes de absorber agua, se denominan quiescentes. Se dice que una semilla (embrión) está quiescente cuando puede germinar inmediatamente después de absorber agua, sin presentar ninguna barrera interna a la germinación.

La latencia es un bloqueo específico a la germinación y no una disminución de la actividad vital de la semilla. Las semillas latentes embebidas son capaces de realizar funciones metabólicas, como la respiración, síntesis de ácidos nucleicos y proteínas, formación de membranas, etc., y en cambio son incapaces de germinar. En las semillas que adquieren latencia secundaria sí que se observa una disminución en la intensidad del metabolismo, lo que no ocurre en la latencia primaria.

2.1.3.1. Latencia primaria y secundaria

Según el momento de la aparición se distingue entre latencia primaria y secundaria. La latencia primaria es la que se produce durante la maduración de las semillas, que son incapaces de germinar en el momento de separarse de la planta madre e inmediatamente después. La latencia secundaria es inducida después de la separación de la planta madre, cuando la semilla embebida está expuesta a condiciones ambientales desfavorables. La latencia secundaria puede ser inducida en semillas no latentes y en semillas que inicialmente poseían latencia primaria debida al embrión.

La latencia primaria puede deberse a las estructuras de las cubiertas o a factores embrionarios, actuando individualmente o en combinación. La latencia debida a las cubiertas ha sido atribuida al menos a los siguientes fenómenos (Cohn, 2006):

- (i) La cubierta es totalmente impermeable e impide la imbibición. Este tipo de semillas se dice que tienen cubiertas duras (*hardseededness*) y su existencia puede demostrarse fácilmente al no variar el peso de las semillas puestas a remojo.
- (ii) La cubierta puede mantener la latencia evitando o limitando el intercambio de gas con el exterior. Aunque existen pocos casos, se ha demostrado que el intercambio restringido de gas puede ser la causa de la latencia en experimentos realizados con semilla latentes, que han germinado al haber sido incubadas en atmósferas con mayor concentración de oxígeno que el aire, o tras haber sufrido una punción.
- (iii) Las estructuras de las cubiertas (como testa, pericarpo o glumas) impiden o restringen la lixiviación de inhibidores del embrión.
- (iv) Las estructuras de la cubierta pueden restringir mecánicamente la elongación y emergencia del eje embrionario.

Si la cubierta es la única causa de la latencia, supuestos (iii) y (iv), la escarificación o la eliminación de la cubierta permitirán la germinación de las semillas.

Si la latencia primaria se atribuye exclusivamente a las propiedades del embrión, puede deberse a uno, o más, de los siguientes fenómenos (Cohn, 2006):

- (i) Existencia de un desequilibrio hormonal en el embrión: la concentración de inhibidores (como el ABA) es demasiado elevada, o la de los promotores del crecimiento (predominantemente GAs, CKs o etileno, según especies) son demasiado bajas.
- (ii) Diferencia en el estatus de las hormonas podría afectar a la expresión de los genes.
- (iii) Algunos aspectos de regulación molecular de la germinación y de la latencia podría ocurrir, sin el control general de las hormonas.
- (iv) Puede haber deficiencias en un proceso metabólico que es especialmente necesario para la germinación.
- (v) Las membranas celulares pueden estar en un estado que no admiten ciertos procesos de transducción.

Semillas con embriones latentes pueden ser estimuladas a germinar por una serie de tratamientos, diferentes para cada especie, como la estratificación, refrigerada o cálida, la luz o la oscuridad, regímenes de temperatura alternante, hormonas promotoras del crecimiento, el secado a temperatura ambiente, la presencia de humo, así como por muchos productos químicos, orgánicos o inorgánicos, de bajo peso molecular en condiciones de laboratorio (Cohn, 2006).

En la naturaleza, la superación de la latencia debida únicamente a la cubierta es un proceso irreversible que conduce a la germinación; en cambio si la causa de la latencia es el embrión, combinada o no a la latencia debida

a la cubierta, la situación es más compleja. Los requerimientos necesarios para la germinación pueden ser satisfechos, total o parcialmente, y que no se produzca la germinación, por ejemplo, debido a una temperatura subóptima, a una falta de agua, o a la profundidad a la que se encuentra la semilla en el suelo. En estas situaciones, una semilla que podía germinar puede adquirir la latencia secundaria. Una vez la semilla ha entrado en este estado, puede interactuar dinámicamente con un grado variable de sensibilidad a los factores ambientales que pueden regular la germinación. Existe controversia entre los especialistas de si estos últimos estímulos representan verdaderos factores de rotura de la latencia, o más bien son desencadenantes de la germinación (Cohn, 2006); sin embargo, es evidente que muchas especies de semillas que poseen latencia embrionaria, cambian de sensibilidad a los factores ambientales de la latencia, que ajustan con precisión en previsión de una germinación exitosa en un ambiente favorable para el crecimiento continuo.

2.1.3.2. Tipos de latencia

Puede ser discutible si la latencia primaria, secundaria, embrionaria o debida a la cubierta, son categorías fundamentales de la latencia, pero con el objetivo de organizar los conocimientos actuales sobre las diferentes formas de latencia en relación a la ecología y a la fisiología de las semillas, se han realizado muchos sistemas de clasificación. Estos sistemas de clasificación están basados en el comportamiento fenomenológico de las semillas, y son una guía para el estudio molecular del proceso que controla la inducción, el mantenimiento o la ruptura de la latencia de las semillas.

En opinión de Baskin y Baskin (2004), de entre los diferentes esquemas publicados de clasificación de la latencia de las semillas, destacan los de Harper, Nikolaeva, y Lang (1987), además por supuesto de la de Baskin y Baskin (1998).

El sistema presentado (en 1957) en el esquema de Harper, probablemente de los más utilizados, incluye las categorías, innata, quiescente, e inducida (equivalente a la latencia secundaria), se considera demasiado restrictivo para considerar todos los tipos de latencia de semilla (Baskin y Baskin, 2004). El sistema “universal” de Lang (Lang, 1987; Lang *et al.*, 1987), de endolatenencia, paralatenencia y ecolatenencia, destinado a ser utilizado en todo tipo de latencia vegetal, no únicamente de las semillas, es demasiado engorroso para ser aplicado a una muestra representativa de semillas (Baskin y Baskin, 2004). El esquema de Nikolaeva, modificado ligeramente por Baskin y Baskin (1998; Tablas 2.1.1 y 2.1.2), es probablemente el sistema de clasificación de la latencia de las semillas más exhaustivo publicado hasta la fecha. Los diversos tipos de latencia en este esquema encajan muy bien en una clave dicotómica, basada en la permeabilidad de la cubierta de la semilla al agua (impermeable vs. permeable), la morfología del embrión (desarrollado vs. no totalmente desarrollado) y las respuestas fisiológicas de la semilla a la temperatura, o a una secuencia de temperaturas (Tabla 2.1.3; Baskin y Baskin, 2004). El esquema utiliza clases, niveles y tipos de latencia de semillas. Una clase puede contener niveles y tipos, y un nivel puede contener únicamente tipos. Se considera que la germinación de las semillas que en la madurez presentan embriones indiferenciados (como en las orquidáceas y otras familias de angiospermas) es un campo de estudio especializado, por lo que este tipo de latencia no está incluida en el citado esquema.

En la tabla 2.1.1 aparecen tres niveles de latencia fisiológica (LFg), profunda, intermedia, y no profunda, cuyas características se resumen en la tabla 2.1.2.

Recientemente, Baskin y Baskin (2014) han propuesto una clave dicotómica (Tabla 2.1.4) para distinguir las diferentes clases de latencia. Estos autores denominan latencia del epicótilo o latencia fisiológica del epicótilo (*epicotyl dormancy o physiological epicotyl dormancy*) a los casos en que existe un largo retraso entre la emergencia de la radícula y la plúmula.

Tabla 2.1.1. Sistema de clasificación de latencia de las semillas propuesto por Baskin y Baskin (1998). No incluye a las semillas con embriones indiferenciados.

Clase A.	Latencia fisiológica (LFg) Niveles: profunda, intermedia, no profunda Tipos: 1, 2, 3, 4, y 5 (de LFg no profunda)
Clase B.	Latencia morfológica (LM).
Clase C.	Latencia morfofisiológica (LMFg). Niveles: simple no profunda, simple intermedia, simple profunda, epicótilo simple profunda, doble simple profunda, compleja no profunda, compleja intermedia y compleja profunda (Tabla 2.1.3)
Clase D.	Latencia física (LF)
Clase E.	Latencia combinada (LF + LFg) Nivel: LFg no profunda (probablemente de los tipos 1 o 2)

Tabla 2.1.2. Características de la latencia de las semillas con latencia fisiológica. Obtenida de Baskin y Baskin (2004) a partir del esquema de Baskin y Baskin (1998).

Profunda

El embrión extirpado produce una plántula anormal

El AG₃ no promueve la germinación

Las semillas requieren 3-4 meses de estratificación refrigerada para interrumpir la latencia

Intermedia

El embrión extirpado produce una plántula normal

El AG₃ promueve la germinación en algunas especies (no en todas)

Las semillas requieren 2-3 meses de estratificación refrigerada para interrumpir la latencia

El almacenamiento en seco puede acortar el periodo de estratificación

No profunda

El embrión extirpado produce una plántula normal

El AG₃ promueve la germinación

Dependiendo de la especie, la estratificación refrigerada (0-10°C) o cálida ($\geq 15^{\circ}\text{C}$) interrumpe la latencia

Las semillas pueden post-madurar en el almacenamiento en seco

La escarificación puede promover la germinación

Tabla 2.1.3. Niveles de latencia morfofisiológica (LMFg), temperatura, o secuencia de temperaturas, requeridas para su interrupción y para el crecimiento del embrión, y respuesta a la adición de AG₃.

Tipo de LMFg ^b	Temperatura requerida ^a		
	Interrumpir latencia	Crecimiento embrión	AG ₃ supera la latencia
Simple no profunda	R o C	R	+ ^c
Simple intermedia	R + C	R	+
Simple profunda	R + C	R	+/-
Epicótilo simple profunda	R + C	R	+/-
Doble simple profunda	C + R + C	R	?
Compleja no profunda	C	C	+
Compleja intermedia	C	C	+
Compleja profunda	C	C	-

^aR, estratificación refrigerada; C, estratificación cálida. ^bLMFg, latencia morfofisiológica. ^c+, si; +/-, si/no; -, no.

Tabla 2.1.4. Clave dicotómica para diferencias los tipos de latencia/no latencia morfológica, morfofisiológica, física, física + fisiológica (combinada); y las dos subclases (epicotilo y regular) de la latencia fisiológica. Para ello se utilizarán semillas maduras de manera natural, incubadas a temperaturas adecuadas para su germinación (Baskin y Baskin, 2014).

1. Embrión diferenciado y desarrollado completamente	2	
2. La semilla embebe agua	3	
3. La emergencia de la radícula ocurre antes de 4 semanas (normalmente pocos días)	4	
4. Tras la emergencia de la radícula, la plúmula emerge en pocos días.	NO LATENTE	
4. Tras la emergencia de la radícula, la plúmula necesita 3-4 (o más) semanas para emerger.	LATENCIA FISIOLÓGICA	DEL EPICOTILO
3. La emergencia de la radícula necesita más de 4 semanas	5	
5. Tras la emergencia de la radícula, la plúmula emerge en pocos días.	LATENCIA FISIOLÓGICA	REGULAR
5. Tras la emergencia de la radícula, la plúmula necesita 3-4 (o más) semanas para emerger.	LATENCIA FISIOLÓGICA	DEL EPICOTILO
2. La semilla no embebe agua	6	
6. Las semillas escarificadas se embeben completamente de agua (normalmente en 1 día) y germinan antes de 4 semanas	LATENCIA FÍSICA	
6. Las semillas escarificadas se embeben completamente de agua (normalmente en menos de 1 día) pero no germinan antes de 4 semanas	LATENCIA COMBINADA	
1. Embrión no desarrollado o no desarrollado completamente	7	

7. Embrión no diferenciado	8
8. Tras la dispersión de las semillas, el embrión se diferencia y crece en la semilla embebida	9
9. La semilla germina antes de 4 semanas	LATENCIA MORFOLÓGICA
9. La semilla no germina antes de 4 semanas	LATENCIA MORFOFISIOLÓGICA
8. Tras la dispersión de las semillas, el embrión nunca se diferencia en un eje radícula-plúmula	10
10. La semilla germina antes de 4 semanas	LATENCIA MORFOLÓGICA ESPECIALIZADA
10. La semilla no germina antes de 4 semanas	LATENCIA MORFOFISIOLÓGICA ESPECIALIZADA
7. Embrión diferenciado pero no desarrollado completamente	11
11. Tras poner las semillas en un sustrato húmedo, el embrión crece, y la semilla germina antes de 4 semanas	LATENCIA MORFOLÓGICA
11. Tras poner las semillas en un sustrato húmedo, el embrión no crece, y la semilla no germina antes de 4 semanas	LATENCIA MORFOFISIOLÓGICA

En las semillas de muchas especies, la latencia no es un estado de todo o nada en el ciclo de la vida de la planta. Las semillas de la mayoría de las especies con latencia fisiológica (LFg) no profunda pasan por una serie de cambios, impulsados por la temperatura, en su capacidad de respuestas fisiológicas a diversos factores entre la latencia y no latencia. Una semilla en los estados intermedios entre semilla “madura con latencia primaria” y semilla “no latente” está en latencia condicional (también denominada latencia relativa). Las semillas con latencia condicional no son capaces de germinar en un amplio rango de condiciones ambientales, al igual que las semillas latentes.

Las condiciones requeridas para germinar se hacen gradualmente cada vez más amplias entre el estado de semilla “madura con latencia primaria” y de semilla “no latente”, y cada vez más estrechas entre el estado de semilla “no latente” y semilla “con latencia secundaria”. Por tanto, las semillas con latencia fisiológica no profunda pueden alternar entre los estados latente y no-latente; es el denominado ciclo de latencia (Baskin y Baskin, 2004).

La latencia física (LF) es causada por una o más capas impermeables al agua de células en empalizada en la cubierta de la semilla o del fruto (Baskin y Baskin, 2004). Se ha asumido que la rotura de la latencia de semillas con LF, bajo condiciones naturales o artificiales, implica la formación de una apertura (*water gap*) en una estructura anatómica especializada de la cubierta de la semilla (o fruto), a través de la cual el agua llega al embrión.

La escarificación puede incrementar la germinación de semillas con LFg no profunda, por lo que no es inusual que algunos investigadores hayan concluido en sus estudios que las semillas de determinados taxones presenten latencia física, consecuencia de una cubierta impermeable, cuando realmente esa cubierta no es impermeable (Baskin y Baskin, 2004). En esos estudios probablemente no se habrá comprobado si la imbibición de las semillas intactas ha sido diferente, o no, a la de las semillas escarificadas.

Las semillas de una especie pueden tener más de un tipo de latencia. El que una semilla sea latente no, puede variar dentro de una especie, y entre semillas individuales. Un lote de semillas puede contener semillas latentes, y también no latentes o con latencia condicional. Por ejemplo, en varias especies de fabáceas la mayor parte de las semillas de un lote presenta latencia física, debida a la impermeabilidad de la cubierta, pero un pequeño porcentaje de semillas no presenta latencia, ya que la cubierta es permeable. Además, semillas de un mismo lote pueden diferir tanto en la clase, como en el nivel de latencia, como es el caso de las semillas de *Frasera caroliniensis*, en que algunas semillas presentan LMFg profunda, y otras semillas LMFg no profunda. Además, la proporción de semillas de esta especie con estos dos tipos de latencia varía entre las semillas de la misma población, producidas en diferentes años, y también hay diferencias entre las semillas recién maduras y las que han pasado el invierno en la planta madre (Baskin y Baskin, 2004).

En la figura 2.1.2 se presenta el árbol filogenético de semillas basado en la morfología interna del embrión y del endospermo, en semillas maduras de angiospermas, realizado por Finch-Savage y Leubner-Metzger (2006) en base a estudios realizados por diversos investigadores; en la figura se indica, junto al nombre de la familia la clase de latencia que presentan sus semillas. Estos autores, que incluyen a la familia *Capparaceae* dentro de la *Brassicaceae*, aunque en el sistema de clasificación APG III (*Angiosperm Phylogeny Group*) se considera a la familia *Capparaceae* independiente de las *Brassicaceae*, dentro del orden *Brassicales*, indican que las *Capparaceae* tienen un embrión periférico, y las semillas o no presentan latencia, o es fisiológica.

ANGIOSPERM SEED PHYLOGENY

EMBRYO ENDOSPERM and additional storage tissue



DORMANCY CLASS

- ND
- PD
- ▽ MD
- ▼ MPD
- ◇ PY
- ✦ PY + PD



Figura 2.1.2. Árbol filogenético de semillas basado en la morfología interna del embrión y del endospermo, en semillas maduras de angiospermas, con indicación (junto al nombre de la familia) la clase de latencia que presentan sus semillas (Finch-Savage y Leubner-Metzger, 2006).

2.1.3.3. Adquisición y rotura de la latencia

La latencia tiene un componente hereditario como se ha demostrado en muchas especies. El grado o profundidad de la misma, también es hereditario. Muchos genes están asociados a la latencia, y su expresión está implicada en el establecimiento de la latencia de las semillas inmaduras. Aunque no todos, la mayor parte de estos genes están conectados con hormonas. Estudios de hibridación realizados con líneas puras, con y sin latencia, han demostrado que la latencia puede ser controlada por los genotipos materno y paterno (Black y Hilhorst, 2006). El ambiente en el que se desarrolla la semilla también influye de manera importante en la adquisición de la latencia.

Según Black y Hilhorst (2006) el establecimiento de la latencia (se entiende que LFg, LM o LMFG) requiere la acción del ABA durante el desarrollo de la semilla, aunque quizás únicamente de manera transitoria. El ABA se acumula en determinados estados del desarrollo de la semilla y la latencia comienza poco después de alcanzar el pico de concentración. La interferencia con el contenido de ABA o la sensibilidad de los tejidos de la semilla al mismo, altera el desarrollo de la latencia. Existen evidencias, por ejemplo, en semillas de especies como el trigo y el girasol (Black y Hilhorst, 2006) de que una vez la semilla ha entrado en latencia, se necesita de la producción subsiguiente de ABA en la semilla hidratada para mantener esa latencia; esta latencia se interrumpe de forma natural durante la post-maduración, y puede también interrumpirse con fluridona, que es un inhibidor de la biosíntesis de ABA.

El ABA actúa sobre uno o varios genes, pero todavía falta profundizar en el conocimiento de los productos génicos que realmente causan la latencia. Dado que la latencia representa una incapacidad para iniciar la extensión celular, generalmente de la radícula, es probable que la acción final de ABA pueda encontrarse allí.

Varios factores ambientales pueden afectar a la inducción de la latencia (Black y Hilhorst, 2006): la temperatura, la calidad de la luz, el fotoperiodo, la humedad del suelo y la nutrición mineral. Las semillas de la misma planta madre no siempre presentan el mismo grado de latencia, por lo que se asume que en estos casos de polimorfismo algún tipo de influencia materna determina la inducción de la latencia. Las interacciones entre el ambiente y el genoma en relación a la latencia son muy complejas. Por ejemplo, los factores ambientales pueden modificar el tamaño y el espesor de las cubiertas, que a su vez pueden influir en la latencia de las semillas (Black y Hilhorst, 2006).

Las semillas maduras, hidratadas, y no latentes, bajo ciertas condiciones pueden ser forzadas a entrar en latencia, la denominada latencia secundaria. Si la germinación es inhibida por temperaturas relativamente altas o por elevados flujos de fotones, las semillas podrían entrar en latencia secundaria, denominándose respectivamente, termolatencia y fotolatencia. Las semillas de varios cultivares de lechuga son ejemplos que presentan ambos fenómenos.

Una semilla con latencia primaria no germinará, aunque esté en condiciones adecuadas sin que antes haya recibido un estímulo para romper la latencia. El agente que proporciona este estímulo no es necesario para la propia germinación, lo que indica que son dos procesos separados (Footitt y Holdsworth, 2006). Además, el agente que actúa sobre la latencia debe estimular la semilla por encima de un valor umbral para iniciar el proceso de interrupción de la latencia. Este umbral puede conseguirse (i) con incrementos al repetirse la estimulación, (ii) gradualmente por una estimulación continua de bajo nivel, o (iii) rápidamente por un evento estimulante que satura (Footitt y Holdsworth, 2006). La magnitud de este valor umbral está determinado por dos componentes que interactúan: (i) la contribución genética de los parentales, y (ii) los factores ambientales que afectan a la semilla durante su desarrollo. Esto da como resultado un rango de niveles de latencia de semillas dentro de una población local, y también entre poblaciones de la misma especie, lo que conduce a diferencias en la interrupción de la latencia y, por tanto, de la germinación a través del

tiempo. A esto se refiere el antiguo adagio de jardinería “Un año de semillas, siete años de malas hierbas”, que refleja la propensión de las semillas de las malas hierbas a perder intermitentemente la latencia durante un largo periodo de tiempo.

2.1.4. Deterioro y longevidad de las semillas

El deterioro de las semillas es el proceso por el cual las semillas pierden vigor, y finalmente mueren. Generalmente el deterioro se define como un daño que se produce con el tiempo (envejecimiento), pero también puede considerarse como un cambio que ocurre en semillas con bajos contenidos de humedad (daño por desecación), o por altas o bajas temperaturas (daños por desnaturalización o por congelación, respectivamente) (Walters, 2006). Aunque las reacciones del deterioro se producen durante el almacenamiento de las semillas, sus efectos suelen detectarse cuando las semillas son puestas a germinar. Tras la imbibición, las semillas deterioradas pueden lixiviar contenidos celulares, crecer lentamente, presentar anomalías, y finalmente no llegar a producir una radícula emergente. En los casos más graves, las semillas deterioradas tienen únicamente un reducido número de células viables que son incapaces de tener un crecimiento organizado, teniendo una baja o nula viabilidad.

El deterioro es causado por el efecto combinado de lesiones, producidas como consecuencia de la desecación o del transcurso del tiempo después de la maduración, y la progresiva inhabilidad para reparar estas lesiones. Las condiciones en las que las semillas son almacenadas afectan de manera importante a la velocidad de su deterioro. Se considera que la humedad relativa (HR) del ambiente, que determina el contenido de humedad de las semillas, es el factor ambiental que más afecta a la velocidad de la pérdida de su viabilidad, especialmente a temperaturas elevadas. Las semillas se deterioran con rapidez en cuanto la HR se incrementa por encima del 20%, denominándose contenido crítico de agua

en el almacenamiento de las semillas, al contenido en agua de las semillas a esta HR, porque a este valor se produce la máxima longevidad de las semillas, para cada temperatura dada de almacenamiento (Walters, 2006 a). La reducción de la temperatura de almacenamiento incrementa la longevidad, de manera que el almacenamiento criogénico de las semillas es una técnica rutinaria en muchos bancos de germoplasma. Parece que la concentración de gases en el entorno de las semillas durante el almacenamiento también puede afectar al deterioro. En este sentido, elevadas presiones parciales de oxígeno aceleran las reacciones de deterioro, al permitir y facilitar que se produzca respiración. Moléculas orgánicas volátiles como el acetaldehído producido por las semillas en almacenamiento pueden acelerar su deterioro. La elevada longevidad obtenida en determinadas semillas almacenadas bajo presiones negativas puede indicar que la conservación al vacío incrementa la longevidad, aunque deberían realizarse estudios para analizar cómo otros factores pueden afectar al deterioro (Walters, 2006 a).

2.1.4.1. Factores que afectan al deterioro de las semillas durante el almacenamiento

Además del ambiente del almacenamiento, la longevidad de las semillas está determinada por varios factores intrínsecos de las semillas, que en conjunto se denominan “calidad de la semilla”. Las semillas de las diferentes especies tienen velocidades de deterioro características, pero dentro de cada especie, la velocidad de deterioro puede variar ampliamente, dependiendo de factores genéticos y de las condiciones de crecimiento.

El factor más importante que determina la longevidad de las semillas es el grado en que la semilla sobrevive al secado. Muchas semillas adquieren durante la maduración una gran habilidad de supervivencia tras el secado, perdiendo esta habilidad durante la germinación. El secado ralentiza muchas de las funciones químicas que provocan el deterioro de las semillas.

Además, la habilidad para sobrevivir al secado está asociada al nivel de quiescencia adquirido a través de cambios celulares que limitan la actividad metabólica. Estos cambios se completan en la madurez fisiológica, que marca el tiempo en que la longevidad potencial de las semillas ortodoxas es máxima. La longevidad de una semilla se ve comprometida tanto cuando es cosechada prematuramente como cuando su cosecha se retrasa (Walters, 2006).

La composición de las reservas de las semillas también puede afectar a su longevidad. Así, generalmente, las semillas que contienen elevadas cantidades de almidón (por ejemplo, las semillas de cereales) tienen un buen almacenamiento. Generalmente las semillas con alto contenido en lípidos tienen un buen almacenamiento, aunque existen ejemplos anecdóticos de semillas con elevados contenidos en lípidos que tienen un almacenamiento deficiente. En base al conocimiento que se tiene de las reacciones que en la peroxidación provocan el deterioro de las semillas, se cree que es posible que las semillas con elevados contenidos de ácidos grasos poliinsaturados son más propensas al deterioro (Walters, 2006 a). Debido a que los carbohidratos de pequeño peso molecular probablemente estabilizan estructuras macromoleculares, también se ha intentado correlacionar la cantidad y la composición de los azúcares con el comportamiento en el almacenamiento. No se han obtenido elevadas correlaciones entre el contenido en azúcares y la longevidad de las semillas de diferentes especies, pero sí que se ha constatado una baja longevidad en semillas, inmaduras o en proceso de germinación, que poseen bajos contenidos de di y trisacáridos, pero un elevado contenido de monosacáridos (como glucosa y fructosa), y también en las semillas de líneas que han sido modificadas genéticamente para tener un bajo contenido en trisacáridos (como los oligosacáridos de la serie de la rafinosa). Elevadas cantidades de azúcares reductores, generalmente presentes en semillas inmaduras y en semillas en germinación, se han asociado a un rápido deterioro. Características morfológicas de la semilla, como la presencia de cubierta dura, parecen incrementar la longevidad, probablemente debido a la barrera que supone para el agua o gases. La latencia también parece aumentar la longevidad de

las semillas, aunque las evidencias que relacionen la latencia con la baja velocidad de deterioro son escasas. Los efectos de los factores de calidad de la semilla en la longevidad no han sido cuantificados, por lo que las predicciones de la longevidad de una población de semillas bajo unas condiciones de almacenamiento específicas, son inciertas (Walters, 2006 a).

Dado que los controles que contribuyen a la longevidad (tolerancia al secado, madurez, latencia, morfología, composición, tolerancia al estrés) están bajo control genético, es probable que en una población heterogénea varíe la velocidad de deterioro entre individuos. La mortalidad asociada al deterioro de la semilla puede causar cambios en la composición genética de una población de semillas, afectando a las características de su fenología, morfología, composición y latencia (Walters, 2006 a).

En el deterioro de las semillas suele distinguirse entre envejecimiento “natural” y “acelerado”, reflejando esta terminología más las condiciones de almacenamiento que los mecanismos de deterioro. Dado que el envejecimiento natural es lento (muchos meses o años), en los ensayos de envejecimiento acelerado se colocan las semillas en unas condiciones que provocan una rápida pérdida de viabilidad. Generalmente estas condiciones son una elevada humedad ($\geq 75\%$) y elevada temperatura ($\geq 35^{\circ}\text{C}$); en estas condiciones el envejecimiento acelerado recibe el nombre “deterioro controlado”.

2.1.4.2. Cinética del deterioro

El modelo de pérdida de viabilidad con el periodo de almacenamiento es consistente entre especies y regímenes de almacenamiento. Inicialmente no hay síntomas de deterioro, pero progresivamente se va produciendo una pérdida de viabilidad. El deterioro en función del tiempo de almacenamiento sigue una curva sigmoidea, con una fase inicial en el que se mantiene la viabilidad, seguida de una fase en

que a pesar de que las semillas germinan, hay una reducción brusca en la tasa de crecimiento de las plántulas, seguida por una disminución de su tolerancia al estrés, y definitivamente se pierde la capacidad de germinación (Figura 2.1.3).

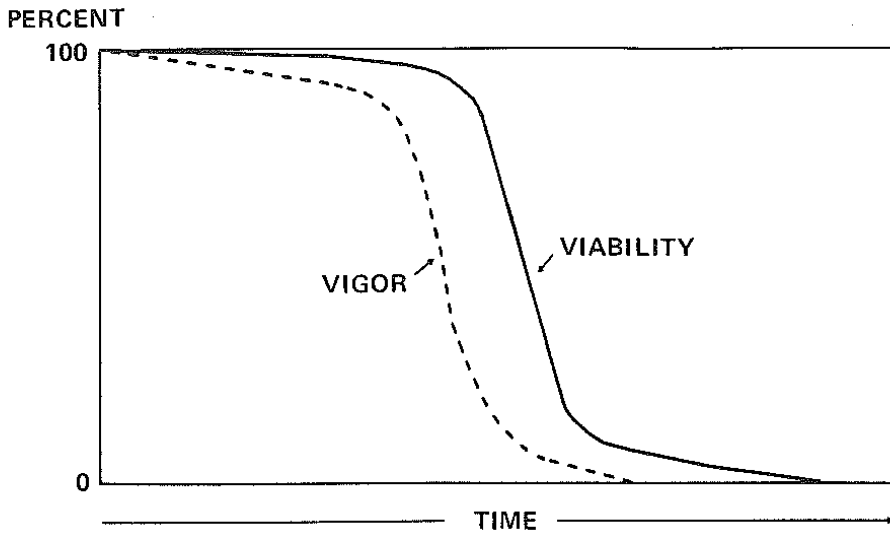


Figura 2.1.3. Disminución de la viabilidad y el vigor con el tiempo de un lote de semillas típico. De Justice y Bass (1979).

Dado que los ensayos de viabilidad y de germinación de las semillas son destructibles, es imposible monitorear el comportamiento de una semilla individual, por lo que la determinación del envejecimiento se realiza en poblaciones de semillas. Otro aspecto difícil de entender en la cinética del envejecimiento de las semillas es el de los procesos que tienen lugar durante la fase inicial, que, aunque es asintomática, dirige inevitablemente a una fase de deterioro más rápido. Este tipo de cinética de reacción es típica de reacciones autocatalíticas, que son reacciones que se producen muy lentamente hasta que la acumulación de productos alcanza un umbral determinado.

2.1.4.2.1. Temperatura de almacenamiento

Aunque todas las semillas se deterioran con el tiempo, la velocidad de deterioro puede controlarse con las condiciones de almacenamiento. Al reducir la temperatura se reduce la velocidad de deterioro casi exponencialmente, con un Q_{10} de aproximadamente 2 para la mayoría de especies. De acuerdo con la primera regla de Harrington, una reducción de 5°C en la temperatura de almacenamiento duplica la esperanza de vida de las semillas. No obstante, planteamientos teóricos y resultados experimentales demuestran que el efecto de la temperatura no es constante en todos los rangos de temperatura (tal y como lo demuestra el gráfico de Arrhenius), y que la variación de temperatura puede tener un reducido efecto en la velocidad de envejecimiento a temperaturas extremadamente bajas.

2.1.4.2.2. Contenido de agua en el almacenamiento

Los efectos del agua en la cinética del deterioro son más complejos y menos conocidos que los de la temperatura. Tradicionalmente se han considerado los efectos del agua independientemente de los efectos de la temperatura. De acuerdo con la primera regla de Harrington, una disminución del 1% en el contenido de agua duplica la vida de una semilla. Sin embargo, el efecto del cambio del contenido de agua en la velocidad de deterioro depende del rango del contenido de agua, de la temperatura y de la especie. Contenidos elevados de agua facilitan las reacciones enzimáticas y producen incrementos en los contenidos de azúcares, ácidos grasos libres y otros sustratos que promueven el deterioro en cascada. Así, la reducción del contenido hídrico a niveles que no promueven reacciones hidrolíticas, afectan a la cinética del envejecimiento. La reducción del contenido hídrico también tiene el efecto añadido de reducir la movilidad en las matrices

acuosas de las células, ralentizando reacciones que son impulsadas en gran parte por difusión. El secado de las semillas por encima de un nivel determinado tiende a incrementar la movilidad molecular, debida quizás a que al eliminar agua la matriz acuosa se hace menos densa, o a que promueve la movilidad de las moléculas que estaba restringida por puentes de hidrógeno. Condiciones extremadamente secas pueden causar la oxidación de metales o eliminar el agua que protege superficies macromoleculares de cambios físicos o químicos, promoviendo la degradación posterior de las moléculas. El contenido hídrico afecta a la cinética del envejecimiento de manera similar a como afecta a la movilidad molecular; el envejecimiento disminuye con el secado hasta un determinado contenido hídrico y un secado posterior no afecta a la cinética cuando las semillas se almacenan a altas temperaturas, y muchas veces provoca un rápido deterioro si las semillas se almacenan a temperatura ambiente o a bajas temperaturas (almacenamiento ultraseco).

Las regiones de hidratación definen el diferente efecto del contenido hídrico en la naturaleza y en la cinética de las reacciones que se producen en las semillas. Las propiedades termodinámicas y de movilidad del agua son diferentes en las tres regiones de hidratación, ya que se producen cambios en la actividad fisiológica en función de cómo interactúa el agua con los solutos y superficies macromoleculares. Las interacciones del agua con los constituyentes celulares se conocen como retención del agua (*water binding*) y refleja el grado en que la movilidad del agua es restringida por otras moléculas. Los contenidos hídricos que caracterizan las regiones de hidratación se conocen como contenidos hídricos críticos. Dado que el contenido hídrico y la temperatura afectan a la cinética de las reacciones (a través de cambios en la movilidad molecular y de la actividad del sustrato), ambos ejercen un efecto interactivo en la cinética del deterioro.

Todas las semillas son higroscópicas, incluso las que tienen cubiertas impermeables, una vez se ha producido una brecha. Las semillas absorben o desorben automáticamente humedad, por difusión, a lo largo de un gradiente de potencial entre la semilla y el aire que la rodea, hasta que se alcanza el equilibrio. El equilibrio se alcanza cuando la semilla no tiene tendencia ni a

absorber ni a perder humedad. Las curvas de equilibrio higroscópico, también denominadas isothermas de sorción, son expresiones gráficas de las relaciones entre el contenido de humedad de las semillas y la humedad relativa (HR) de su ambiente, a temperatura constante. Han sido determinadas midiendo la absorción o la desorción a sucesivas HR, y pueden ser utilizadas para predecir el contenido de humedad de la semilla a cualquier HR dada.

Las isothermas de sorción son unas curvas sigmoideas, con tres fases distintas, que representan diferentes estados de absorción o desorción de agua (Figura 2.1.4), y son importantes con respecto a la longevidad de las semillas (Copeland y McDonald, 1995; Probert y Linington, 2006 b).

. Fase I: Agua fuertemente unida a posiciones iónicas (agua retenida). Representa el agua muy bien retenida, que puede ser realmente parte de la estructura química de la semilla. Este tipo de agua no puede ser extraída sin la destrucción del tejido de la semilla. Esta fase puede incluir también un poco de agua retenida como moléculas discretas en la unión con las moléculas de tejido de la semilla.

. Fase II: Agua débilmente unida a posiciones polares, no iónicas (agua adsorbida). Representa el agua que está menos retenida que la de la fase I. En la mayor parte de las semillas, esta zona del equilibrio de humedad está representada por una relación lineal entre la HR y el contenido de humedad. El agua correspondiente a la parte superior de la fase II es fácilmente extraída en el secado; sin embargo, la parte inferior que corresponde a una unión fuerte, es difícil de extraer. El agua correspondiente a la parte superior de la fase II contribuye significativamente al deterioro de la semilla durante el almacenamiento.

. Fase III: Agua débilmente unida a través de puentes de fracciones hidrófobas (agua libre). Representa al agua débilmente retenida por enlaces muy débiles y el agua libre en los espacios intercelulares y entre los tejidos. Es fácilmente eliminada durante el secado, pero si no es eliminada, contribuye al rápido deterioro de la semilla.

Mientras los contenidos hídricos que delimitan las regiones hídricas varían con la temperatura y con la especie, las humedades relativas correspondientes a estos contenidos críticos son bastante constantes. Por ejemplo, en las semillas la respiración es favorecida a contenidos hídricos que corresponden a 85-90% de HR. Para la mayor parte de células y tejidos, las reacciones hidrolíticas se producen a $HR \geq 75\%$, que es el umbral para los test de envejecimiento acelerado con elevada humedad. El contenido hídrico crítico que produce una longevidad máxima, oscila entre 3 y 8% para la mayoría de las especies, que se corresponden con HR de 18 a 25% para una temperatura de almacenamiento dada.

Las isotermas muestran la tendencia general de incremento del contenido hídrico al disminuir la temperatura para una HR constante (Probert y Linington, 2006 a). Dado que las regiones de hidratación corresponden a valores críticos de HR, el valor del contenido hídrico crítico aumenta al disminuir la temperatura. Utilizando las relaciones isotermas se puede determinar el contenido hídrico crítico de cualquier especie a una temperatura determinada. Estas relaciones sugieren que existen diferentes estrategias para obtener el contenido hídrico crítico. Vertucci y Roos (1990) proponen que el equilibrio de las semillas entre 19 y 27% de HR proporciona el nivel de humedad óptima para mantener la longevidad en almacenamiento a largo plazo.

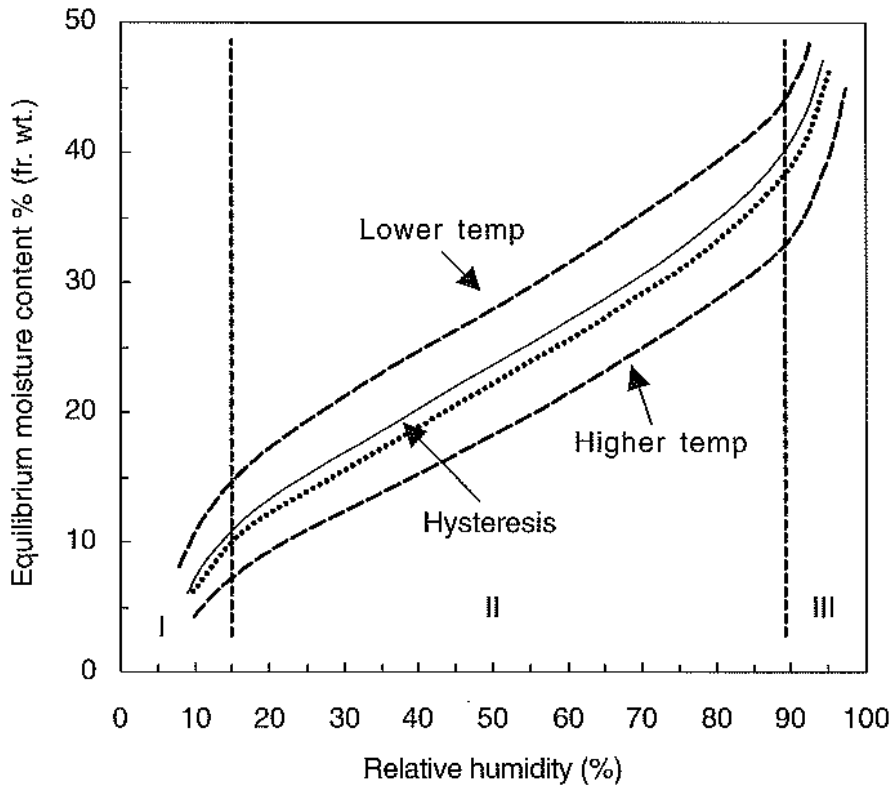


Figura 2.1.4. Ilustración de isoterma de sorción. La línea sólida representa una isoterma de desorción típica de una semilla no oleaginosa. Las líneas a trazos muestran el efecto del descenso o del incremento de la temperatura en el equilibrio de humedad. La línea punteada ilustra una isoterma de absorción y el fenómeno de histéresis; para una humedad relativa dada, las semillas contienen ligeramente menos agua en la absorción que en la desorción. Las líneas a trazos verticales separan las tres regiones de retención de humedad. De Probert y Linington, 2006 a.

2.1.4.2.3. Interacciones contenido hídrico-temperatura

Las interacciones entre el contenido hídrico, la temperatura y la calidad de la semilla, en la cinética del deterioro puede resumirse en la ecuación genérica que describe las reacciones espontáneas: $J = -\Delta G/R$, donde la velocidad de reacción (J) es igual a la fuerza impulsora (ΔG) dividida por la resistencia (R). La fuerza impulsora es un término energético que depende de la concentración de los sustratos y de los productos de la reacción, y es el que determina si una reacción es posible; es la diferencia entre la energía libre de los reactivos y de los productos (Walters, 2005). El término ΔG es útil para determinar cómo los cambios en las condiciones de almacenamiento o en la calidad de la semilla afecta a la probabilidad general de una reacción. Por ejemplo, las reacciones exotérmicas (las que se producen a través de una pérdida de entalpía) son típicamente favorecidas al bajar la temperatura. Así, muchas de las reacciones físicas implicadas en el deterioro de las semillas (por ejemplo, la cristalización de lípidos polares, azúcares y agua) son termodinámicamente más viables a bajas temperaturas. En cambio, las reacciones endotérmicas (las que se producen por un incremento de entropía) son más probables cuando se incrementa la temperatura (por ejemplo, la desnaturalización de proteínas). Las reacciones químicas implicadas en el envejecimiento de las semillas liberan calor e incrementan la entropía, son afectadas por la temperatura a través de cambios en los coeficientes de equilibrio de las concentraciones de productos y reactivos (Walters, 2004). Al igual que la temperatura, el contenido hídrico afecta a la fuerza impulsora de las reacciones, afectando a la concentración de sustratos y a la probabilidad de que se produzcan cambios como la cristalización (promovida a bajos contenidos hídricos). Los contenidos hídricos críticos o las temperaturas de transición marcan un cambio en la probabilidad de las reacciones. Más adecuado que expresar los contenidos hídricos críticos, es expresarlos en base a las humedades relativas críticas, porque la HR es una expresión termodinámica de la concentración de agua. Las HRs que son críticas para los mecanismos del deterioro de las semillas son 20-25% y 75-85% (Walters, 2006 a). Las

velocidades de envejecimiento se incrementan cuando los contenidos hídricos descienden por debajo de la HR crítica de 20 - 25%, sugiriendo que las reacciones implicadas en el deterioro a este nivel de agua son exotérmicas y por tanto serán promovidas con el descenso de la temperatura. La conclusión es que el excesivo secado o enfriamiento promoverá el deterioro, y por tanto la esperanza de vida será limitada. Queda por definir el valor exacto de la temperatura y del contenido hídrico que proporciona máxima longevidad, aunque probablemente sea menor que -18°C y entre 5 y 20% de agua, dependiendo de la especie.

El factor resistencia (R) es también importante al influir en la velocidad a la que se produce el deterioro, y representa las obstrucciones a las reacciones, bien por movilidad molecular limitada, o por secuestro de los reactivos fuera de los sitios de reacción (Walters, 2005). Aunque ciertas reacciones celulares son termodinámicamente favorecidas durante el deterioro, pueden no ocurrir porque existan barreras físicas o termodinámicas que las prevén. El coeficiente de temperatura o energía de activación (E_a) es una barrera termodinámica que determina cuántas moléculas de energía debe haber para permitir una reacción espontánea. Cubiertas de semillas que bloquean la difusión de humedad u oxígeno, o membranas que secuestran sustratos, son ejemplos de barreras físicas. Además de sus efectos en la fuerza impulsora de las reacciones (ΔG), la temperatura y el contenido hídrico tienen una contribución significativa al factor de resistencia (R) porque controlan directamente la movilidad celular. El desarrollo de esta idea de factor de resistencia ha contribuido a la comprensión del papel de las moléculas vítreas en el deterioro lento de las semillas. El material vítreo se forma cuando el tejido es concentrado o enfriado (Buitink et al., 1998), y las asociaciones intermoleculares producen el endurecimiento del material. El cambio en las propiedades mecánicas es relativamente abrupto y se produce a la temperatura de transición vítrea (T_g). Un mayor enfriamiento del material vítreo provoca una mayor restricción de la movilidad molecular hasta el punto que las reacciones físicas y químicas no pueden ser medidas en una escala de tiempo práctica. La temperatura a la cual la movilidad molecular es hipotéticamente cero se

denomina Temperatura Kauzmann (T_K) y la ratio de T_g y T_K define el coeficiente de temperatura para la movilidad molecular. La movilidad molecular en los tejidos nunca es cero, y por tanto el envejecimiento es inevitable (Walters, 2006 a). Muchas de las investigaciones realizadas en el comportamiento del material vítreo de las semillas, han obtenido la relación entre el contenido hídrico y T_g , la cual presenta poca diferencia entre las semillas que mueren inmediatamente tras el secado, de las que lo hacen relativamente rápido con el tiempo de almacenamiento, y de las que mueren muy lentamente. Esto sugiere que el estado vítreo no protege, *per se*, las células del deterioro, sino que más bien la movilidad molecular dentro del estado vítreo es la barrera operativa de las reacciones de deterioro (Buitink et al., 1998; Walters, 2006 a). La formación del estado vítreo “*per se*” no es suficiente en la mayoría de de las especies para sobrevivir durante más de 20 años (Walters, 2005). Las semillas que son almacenadas bajo condiciones criogénicas tienen el riesgo de la formación letal de hielo, dado que las reacciones de cristalización son promovidas a bajas temperaturas. El enfriamiento y el calentamiento rápidos, ajustando el contenido hídrico, o añadiendo solutos, protegen a las células de la formación de hielo, dado que la movilidad molecular puede ser suficientemente restringida antes de que el agua forme núcleos y los cristales crezcan. La consecución del estado vítreo es el primer paso en la crioprotección. Los materiales deben ser almacenados a temperaturas muy por debajo de T_g (preferentemente por debajo de T_K) para limitar la recristalización y mantener la viabilidad. Al igual que otras reacciones físicas y químicas que dirigen a la muerte de las células, la cinética de la formación de hielo bajo la criopreservación no ha sido cuantificada, siendo difícil predecir la esperanza de vida; la viabilidad de células criopreservadas después de hasta 40 años de almacenamiento proporciona garantías razonables de que el tiempo para estas reacciones es realmente largo (Walters, 2006 a).

2.1.4.3. Prevención del deterioro

Las semillas que adquieren de manera natural la capacidad de sobrevivir al estrés inicial de la deshidratación, poseen la capacidad de sobrevivir en el estado deshidratado. Por tanto, la mayor parte de los mecanismos para la tolerancia a la deshidratación están también implicados en la longevidad de las semillas. Generalmente, los considerados protectores de la vida en estado deshidratado están omnipresentes entre las formas de vida. Los mecanismos protectores se dividen en dos tipos de estrategias (Walters, 2006 a): (i) reducción de la fuerza impulsora de las reacciones de envejecimiento (ΔG); (ii) obstrucción del progreso inevitable de estas reacciones (R). La concentración de sustratos para las reacciones de envejecimiento puede ser reducida directamente, o compitiendo por reactivos que son menos dañinos para la célula. Por ejemplo, un medio efectivo para disminuir la reacción de Maillard (glucosilación no enzimática) es reducir la cantidad de azúcares reductores a través de la polimerización de los azúcares en almidón, o en oligosacáridos de la serie de la rafinosa, un proceso que tiene lugar durante los últimos estados de la embriogénesis (Walters, 2006 a). Este estado de embriogénesis está también marcado por la desdiferenciación de orgánulos que conducen a una menor capacidad metabólica. La quiescencia resultante disminuye la concentración de productos intermedios de alta energía de la respiración, reduciendo así las especies reactivas de oxígeno (*reactive oxygen species*; ROS). Enzimas antioxidantes como la catalasa, la peroxidasa y la superóxido dismutasa, catalizan la eliminación de ROS de las células antes y después del almacenamiento. Durante el almacenamiento, antioxidantes como el tocoferol desactivan ROS y radicales libres. El tocoferol es oxidado por los radicales libres, pero la oxidación no se perpetúa en cascada porque el electrón desemparejado está deslocalizado dentro de la estructura de anillo de la molécula. Cuando el tocoferol oxidado es reducido por el ascorbato, está disponible para actuar de nuevo.

Las barreras protectoras que ralentizan las reacciones pueden ser inhibidores potentes de reacciones de envejecimiento. Por ejemplo, las cubiertas duras de las semillas limitan la difusión del agua y del aire, haciendo que las semillas con estas cubiertas impermeables sean más longevas, especialmente bajo condiciones fluctuantes de almacenamiento. El secado y el enfriamiento ralentizan de forma natural las reacciones al reducir la movilidad molecular, pero los azúcares pueden tener un efecto protector adicional debido a su gran capacidad de formar estado vítreo (Walters, 2006 a).

2.1.4.4. Reacciones del deterioro

Todos los constituyentes del citoplasma de las células se degradan durante el almacenamiento, y el grado en que cada uno afecta a la viabilidad de la semilla depende de la importancia de cada constituyente particular en la función de la célula, la cinética de su degradación, el potencial de reacciones en cascada (autocatalítica), y la presencia de mecanismos protectores y reparadores (Walters, 2006 b). Existen muchas reacciones potenciales, físicas y químicas, que contribuyen al envejecimiento de la semilla al afectar negativamente a la función molecular, sin embargo, la diversidad de subproductos producidos, hace difícil medir directamente el progreso de las reacciones de deterioro.

2.1.4.4.1. Reacciones físicas involucradas en el deterioro

Las reacciones físicas alteran la estructura de las macromoléculas o la distribución de las moléculas dentro de las células. Estos cambios son impulsados por la temperatura y la humedad existentes, y su incidencia se describe principalmente en el estado de equilibrio, utilizando diagramas de

fase. La incidencia puede ser evaluada por el tiempo necesario para alcanzar el estado de equilibrio. Frecuentemente, cuando las semillas se sacan del almacenamiento, se invierten las reacciones físicas, y por tanto su importancia en el deterioro de las semillas es subestimada, a no ser que se produzcan cambios químicos, que puedan ser monitoreados.

Los cambios físicos más conocidos que se producen en las células de las semillas durante el almacenamiento son los cambios de fase de los lípidos polares de las membranas. Los mecanismos pueden dar lugar con el tiempo a la pérdida de la función de membrana, ya sea a través de la fusión entre orgánulos, la inactivación de proteínas asociadas a la membrana, o cambios en la permeabilidad selectiva de la membrana.

La desnaturalización de proteínas provoca la pérdida de la función enzimática, es impulsada por valores elevados de temperatura y de concentración iónica, pero es ralentizada por las condiciones secas. Durante el almacenamiento de las semillas muchos enzimas pierden actividad y las proteínas se vuelven menos extraíbles. Sin embargo, es difícil de demostrar la relación entre la pérdida de enzimas y la desnaturalización de proteínas (Walters, 2006 b).

Supuestamente las moléculas de azúcar protegen a lípidos polares y proteínas de cambios estructurales, y la cristalización de los azúcares puede eliminar este efecto protector. La cristalización lenta de los azúcares, especialmente sacarosa, ha sido relacionada con el envejecimiento, y las moléculas que retardan la cristalización, por ejemplo, los azúcares de la serie de la rafinosa, pueden incrementar la longevidad de las semillas. Esta idea se basa en el comportamiento de los azúcares en soluciones relativamente puras en las que se promueve la cristalización; en cambio la cristalización de los azúcares en el citoplasma es menos probable, y no ha sido demostrada durante el deterioro de las semillas. Los almidones forman geles cuando son expuestos a condiciones de elevadas humedades y temperaturas, reminiscentes del envejecimiento acelerado. La estructura física de los granos de almidón afecta a la cinética de despolimerización del

almidón y a la naturaleza de los complejos proteína-almidón o lípidos-almidón.

La disponibilidad de agua y temperatura también afecta a las interacciones hidrofílicas e hidrofóbicas, que, a su vez, afectan al reparto de moléculas anfifílicas [que tienen un extremo hidrofílico (que es soluble en agua) y otro hidrófobo (que rechaza el agua)] en áreas acuosas y en áreas ricas en lípidos. La difusión de componentes tóxicos a regiones susceptibles de las células, o de moléculas protectoras a regiones donde no son muy efectivas, pueden tener efectos importantes en la naturaleza y cinética de las reacciones de deterioro.

La lenta cristalización de las moléculas de agua durante el crioalmacenaje de las semillas hidratadas, causará deterioro progresivo por daños de congelación. Esta forma de envejecimiento es de esperar en semillas recalcitrantes, que permanecen hidratadas durante el crioalmacenamiento, pero todavía ha de demostrarse dado que el crioalmacenamiento de semillas recalcitrantes es una tarea reciente.

2.1.4.4.2. Reacciones químicas involucradas en el deterioro

Las reacciones químicas que se producen durante el almacenamiento pueden ser clasificadas, en hidrolíticas, oxidativas y peroxidativas (Walters, 2006 b). Estas reacciones están promovidas respectivamente a altas, medias o bajas H R, pero el balance de los diferentes tipos de reacciones cambia a medida que cambia la concentración de los sustratos dentro de la célula. La mayor parte de las reacciones de deterioro conducen a la fragmentación de las moléculas grandes en otras más pequeñas.

2.1.4.4.2.1. Reacciones hidrolíticas

Tienen lugar durante el almacenamiento, especialmente a elevada humedad, y puede producir la rancidez (acumulación de ácidos grasos libres) o una cascada de reacciones oxidantes que producen la escisión de los polímeros, o enlaces cruzados dentro de los polímeros. Ejemplos de reacciones hidrolíticas son la des-esterificación de los lípidos en ácidos grasos libres y glicerol, la despolimerización de almidones en azúcares simples, y el paso inicial de la reacción de Maillard, todas las cuales requieren la presencia de moléculas de agua.

La reacción de Maillard es una glucosilación no enzimática de proteínas; es un conjunto de reacciones que producen melanoidinas de diferentes colores (que van desde el amarillo claro hasta el negro) y diferentes compuestos aromáticos. Para que tenga lugar es necesario la presencia de un azúcar reductor y un grupo amino libre, proveniente de un aminoácido o una proteína, y puede producirse durante el calentamiento de los alimentos o durante su almacenamiento prolongado. Es la causante del color marrón de la carne y del pan, cocinados al horno. En este conjunto de reacciones se producen unas moléculas que dan sabor y aroma a los alimentos, pero que, como la acrilamida, pueden ser cancerígenos. Wettlaufer y Leopold (1991) obtuvieron en semillas de soja (*Glycine max* L. cv Hodgson) mayor velocidad en la reacción de Maillard en condiciones de elevadas temperaturas y de HR, y concluyeron que el incremento de los productos de la reacción de Maillard están asociados a la pérdida de poder germinativo de las semillas.

2.1.4.4.2.2.- Reacciones oxidativas

Este tipo de deterioro puede producirse a través de reacciones de oxidación-reducción que eliminan electrones del carbono (oxidación), o a

través de inserción directa oxígeno en la molécula (peroxidación) (Wilson y McDonald, 1986; Priestley, 1986; Walters, 2006 b). Aunque el deterioro oxidativo puede ocurrir a través de mecanismos no enzimáticos, catalizados por el oxígeno, el calor, la luz y metales, las reacciones de oxidación-reducción en las células son normalmente catalizadas por enzimas, haciendo uso de agentes oxidantes como el NAD, iones metal o grupos sulfhidrilo (-SH) para recuperar energía de las reservas almacenadas (β -oxidación de ácidos grasos o glicolisis) o controlar el potencial redox. La medida en que los enzimas catabólicos participan en reacciones de envejecimiento en las semillas no está claro, aunque el consumo de las reservas es una hipótesis que se ha utilizado siempre para explicar la pérdida de viabilidad durante el almacenaje.

Cuando las células presentan un estrés hídrico (potencial hídrico < -2MPa) se produce un metabolismo incompleto o desequilibrado, resultado de cambios en la actividad enzimática, cambios en la concentración de sustratos, o pasos de fosforilación desacoplados en la respiración (transporte de electrones sin producción de ATP). Esto produce una acumulación de oxígeno parcialmente reducido o de otros productos intermedios de alta energía. Estos subproductos de las reacciones de oxidación, conocidos como ROS, son radicales libres o conducen inmediatamente a la producción de radicales libres. Al ser ávidos en electrones, los radicales libres son extremadamente electrofílicos y atacan regiones densas de electrones presentes en todos los polímeros orgánicos, creando más radicales libres y la degradación adicional en una reacción autocatalítica en cascada, denominada auto-oxidación (Walters, 2006 b). El DNA es particularmente sensible a la oxidación de sus bases y de su cadena azúcar fosfato, por los radicales libres, que a su vez producen roturas en la cadena simple. Estas roturas producen, a su vez, más daños a las bases y/o la rotura de la doble cadena.

2.1.4.4.2.3. Reacciones de peroxidación

La molécula de oxígeno es extremadamente electrofílica y puede formar hiperóxidos (R-O-O-H) al reaccionar directamente en una reacción peroxidativa con los sustratos insaturados, p. ej. ácidos grasos. Dado que el enlace peróxido es débil (es un enlace simple en lugar del enlace doble del oxígeno molecular), se rompe con facilidad y se forma el radical hidroxilo (oxidante fuerte), iniciando la auto-oxidación en cascada. Las reacciones peroxidativas son catalizadas por metales, el calor y la luz. Los numerosos mecanismos por los cuales se pueden degradar las macromoléculas a través de reacciones de oxidación, producen una elevada cantidad de subproductos (Van Bilsen y Hoekstra, 1993), entre ellos el malondialdehído y el hidroxi-trans-nonenal, que dañan el DNA y causan enlaces cruzados en las proteínas. La oxigenación de los ácidos grasos y la pérdida de dobles enlaces provocan una mayor permeabilidad de la membrana y una disminución de la fluidez (Walters, 2006 b).

2.1.5. Estudios realizados

Para alcanzar los objetivos indicados en el apartado 1.8.2, la tesis doctoral se ha estructurado en dos partes, propagación sexual y asexual. En cuanto a la propagación sexual se han realizado los siguientes estudios:

- . Histología de los órganos reproductivos de *C. spinosa* L. subsp. *rupestris*.
- . Análisis de la absorción de agua por parte de las semillas.
- . Poder germinativo de las semillas de las subespecies *rupestris* y *spinosa* de *C. spinosa* L.
- . Análisis de la absorción de agua por parte de las semillas de *C. spinosa* L. subsp. *rupestris*.
- . Influencia de la edad de las semillas de *C. spinosa* L. subsp. *rupestris* en su germinación.
- . Influencia del tratamiento de las semillas de *C. spinosa* L. subsp. *rupestris* con radiación láser He-Ne e incubación enzimática, en la germinación de las mismas.
- . Efecto de la estratificación en la germinación de las semillas de *C. spinosa* L. subsp. *rupestris*.

2.2. MATERIAL Y MÉTODOS

2.2.1. Material vegetal

Salvo que se indique lo contrario, el material vegetal utilizado en esta tesis doctoral procedía de las plantas (Fotografía 2.2.1 a) cultivadas en una parcela 214 del polígono 26 del término municipal de Valencia (Fotografía 2.2.1 b), perteneciente al Campus de Vera, de la UPV ($39^{\circ} 38' N$, $0^{\circ} 22' W$).



Fotografía 2.2.1. Planta de alcaparra (a) y localización (b) de la parcela de procedencia del material vegetal utilizado.

Para conseguir uniformidad en las semillas, durante las fechas indicadas en cada experimento, de cada rama se recolectaron diariamente los tres frutos que seguían al último fruto dehiscente. Las semillas fueron extraídas del fruto eliminándose los restos de pulpa adheridos a ellas mediante frotación y lavado, desechándose por decantación las semillas inmaduras. Para prevenir infecciones parasitarias, las semillas fueron desinfectadas en una solución de hipoclorito sódico al 25% durante 2 minutos, seguida de varios lavados con agua corriente. A continuación, se dejaron secar sobre papel de filtro. Las semillas se almacenaron en botellas

de vidrio herméticas a temperatura de laboratorio, hasta que se realizaron los respectivos test. La humedad de las semillas, determinada por triplicado tras el secado a 103°C (ISTA, 2007) en estufa de aire forzado (Selecta, 297B), osciló entre 7.1 y 7.3%.

2.2.2. Ensayos de viabilidad de las semillas

La viabilidad de las semillas se determinó mediante la realización del test de viabilidad, siguiendo el Manual de Ensayos al Tetrazolio del Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación (MAPA; Moore 1985) y el manual publicado por *The International Seed Testing Association* (ISTA; Leist *et al.*, 2003), realizando cuatro repeticiones, con 10 semillas por repetición. Para facilitar la entrada del reactivo en el endospermo y el embrión de la semilla, se realizó un pequeño corte longitudinal a través de la cubierta, en la parte opuesta a la zona micropilar (Corner, 1976; Moore, 1985), realizando la incisión con un bisturí, teniendo sujeta la semilla con una pinza metálica. Tras el corte, las semillas se sumergieron en la solución del tetrazolio (Tetrazolium Red. 2,3,5-Triphenyltetrazolium chloride; Sigma), en vasos de precipitado de 50 mL, y se mantuvieron en oscuridad durante 24 horas a 30°C (Leist *et al.*, 2003).

El Manual de Ensayos al Tetrazolio del MAPA (Moore, 1985) establece cuatro categorías de indemnidad del tejido: sano; débil, pero viable; débil, no viable; y muerto; con la siguiente descripción:

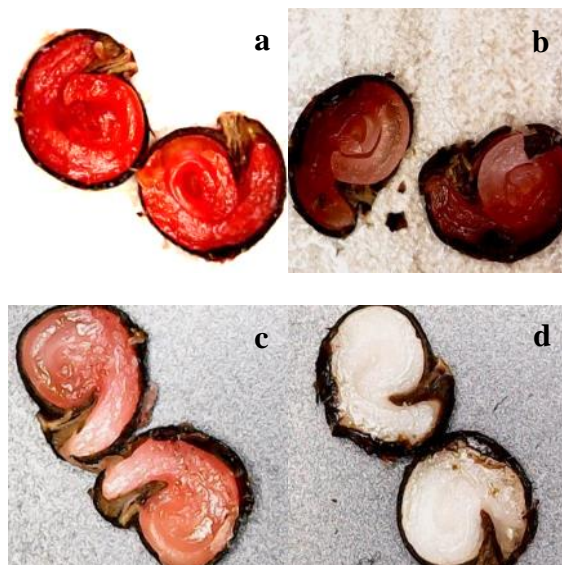
-Tejidos sanos (a). Tienden a teñirse gradual y uniformemente desde las superficies externas hacia el interior. Dentro de los tejidos, el color rojo es brillante y lustroso, especialmente si no están excesivamente teñidos. Las superficies cortadas se tiñen más fácilmente que los tejidos con las membranas intactas. Los tejidos internos tienden a ser de color rosado-amarillo o amarillento-blanco, ya que el color no ha tenido tiempo de formarse. Los tejidos sanos y húmedos presentan una elevada turgencia.

-Tejidos débiles y viables (b). Varían en grados de deterioro, desde los casi totalmente sanos hasta los tejidos teñidos débiles y no-viables, o tejidos muertos no-teñidos. La tinción y las características del tejido también varían con la naturaleza y el grado del deterioro. Las superficies de corte de los tejidos teñidos, tienden a ser más brillante de lo normal.

-Tejidos teñidos débiles, no viables (c). Incluyen un embrión completo, o pueden estar rodeados de tejidos viables sanos y/o débiles. El color puede ser rojo purpureo, o grisáceo y puede variar en intensidad desde el rojo oscuro a rojo pálido o rosáceo. Las superficies cortadas en el eje del embrión anteriormente a la tinción, pueden aparecer blanquecinas, mientras que los tejidos interiores pueden aparecer de color rojo oscuro.

-Tejidos no teñidos, muertos (d). De manera habitual pueden surgir dudas acerca de si los tejidos no-teñidos son viables o si son tejidos muertos. Las características del tejido proporcionan, generalmente esta respuesta. Los tejidos muertos son flácidos, borrosos o grisáceo-blancos y sin brillo. Los tejidos no-teñidos y viables, suelen ser turgentes, brillantes y rosados o blanco amarillento”.

La ISTA (Leist *et al.*, 2003) presenta para las semillas de *C. spinosa* unos ejemplos de semillas no viables, pero no hace ninguna referencia a la debilidad, o no, de las semillas viables, Las características del tejido varían según especie, duración del remojo y temperatura, por lo que siguiendo los criterios del MAPA (Moore 1985), se ha propuesto la clave presentada en la fotografía 2.2.2, para evaluar la viabilidad de las semillas de *C. spinosa*, discriminando entre los cuatro grupos de tejidos.

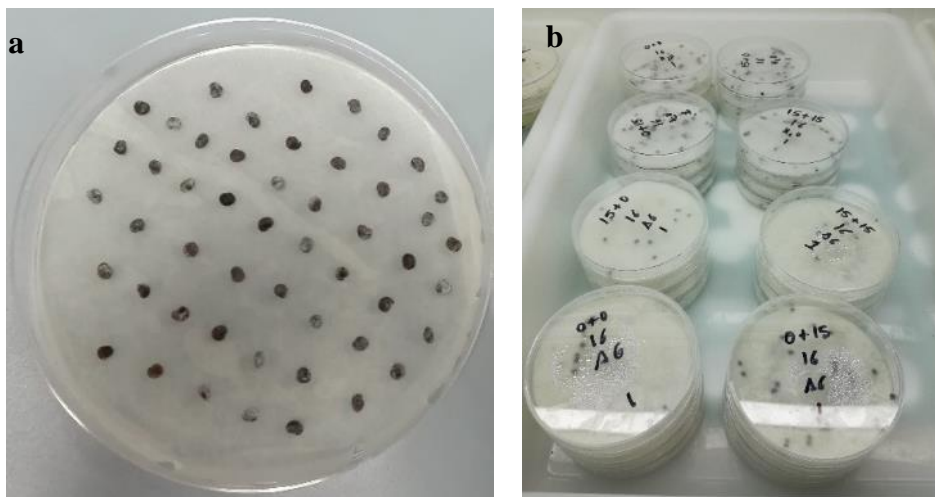


Fotografía 2.2.2. Clave utilizada en el ensayo al tetrazolio de las semillas de *C. spinosa* para discriminar entre las cuatro categorías de indemnidad del tejido: a) sano; b) débil, pero viable; c) débil, no viable; d) muerto.

2.2.3. Ensayos de germinación de las semillas

Los ensayos de germinación se realizaron mediante el método BP (*Between Paper*) de las Reglas Internacionales para Ensayos de Semillas (ISTA, 2007), utilizando papel de filtro de grosor medio (73 g m^{-2}) previamente esterilizado en autoclave. Se colocaron 50 semillas entre dos capas del citado papel de filtro en el interior de la placa de Petri de 9 cm de diámetro, distribuyéndolas uniformemente evitando el contacto entre ellas (Fotografía 2.2.3). El papel se humedeció con una solución de AG₃ a la concentración de 500 ppm (Ácido giberélico 1,6% p/v), o en su caso, con agua destilada. Se realizaron 4 repeticiones por tratamiento, que se colocaron en una cámara de germinación (Climatronic), con control de temperatura (30°C durante el día y 20°C durante la noche), de humedad

relativa (85%) y de fotoperiodo (12 horas diarias), con iluminación de 15000 luxes, proporcionada por tubos fluorescentes blancos fríos.



Fotografía 2.2.3. Disposición de las semillas comerciales en placa Petri para el ensayo de germinación (a). Disposición de las placas Petri de diferentes tratamientos en la cámara de cultivo (b).

Los ensayos se consideraron satisfactorios cuando la diferencia entre los porcentajes de germinación máximo y mínimo de las cuatro repeticiones no sobrepasaba la tolerancia establecida por las Reglas Internacionales para Ensayos de Semillas (ISTA, 2007). Salvo que se indique lo contrario, los ensayos tuvieron una duración de 100 días, humedeciéndose las placas y registrando el número de semillas germinadas cada dos-tres días. Una semilla se consideró germinada cuando presentaba la radícula visible.

Los datos obtenidos en los ensayos de germinación de semillas pueden ajustarse a curvas de germinación, modelos matemáticos que posibilitan una descripción completa de la germinación. Estudios previos realizados en semillas de *C. spinosa* (Pascual *et al.*, 2003) han concluido que el modelo logístico resulta adecuado para el análisis de los datos de

germinación. En el presente trabajo se ha aplicado la función logística, utilizando el paquete estadístico STATGRAPHICS 5.1.

La función logística aplicada a la germinación tiene la siguiente expresión:

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

G= Germinación acumulada (%).

A= Máximo porcentaje de germinación.

t = Periodo de germinación (días).

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

k= Parámetro de velocidad.

A partir de los resultados obtenidos, se han calculado los parámetros con significado biológico, como la velocidad media relativa de germinación acumulada ($k/2$), y el número de días necesarios para alcanzar el 50% del porcentaje de germinación final ($\beta/k = t_{50}$).

2.2.4. Análisis estadístico

Los resultados de los respectivos estudios se han analizado mediante análisis factorial de la varianza, utilizando el programa STATGRAPHICS Centurion XVI (StatPoint Technologies 2013). Cuando un efecto ha resultado significativo ($P < 0,05$), se ha realizado la separación de medias mediante el test LSD ($P < 0,05$). En todos los casos, previo a la realización del análisis de la varianza se ha comprobado que las series de datos siguen una distribución normal, y previo a la realización del análisis de la varianza, los valores porcentuales, han sido transformados mediante la expresión $\arcsin \sqrt{x}$.

2.2.5. Locales

Los ensayos de laboratorio se han realizado en los laboratorios de Fitotecnia General y de Citricultura, del Departamento de Producción Vegetal, de la Escuela Técnica Superior de Ingeniería Agronómica y del Medio Natural, en la Universitat Politècnica de València.

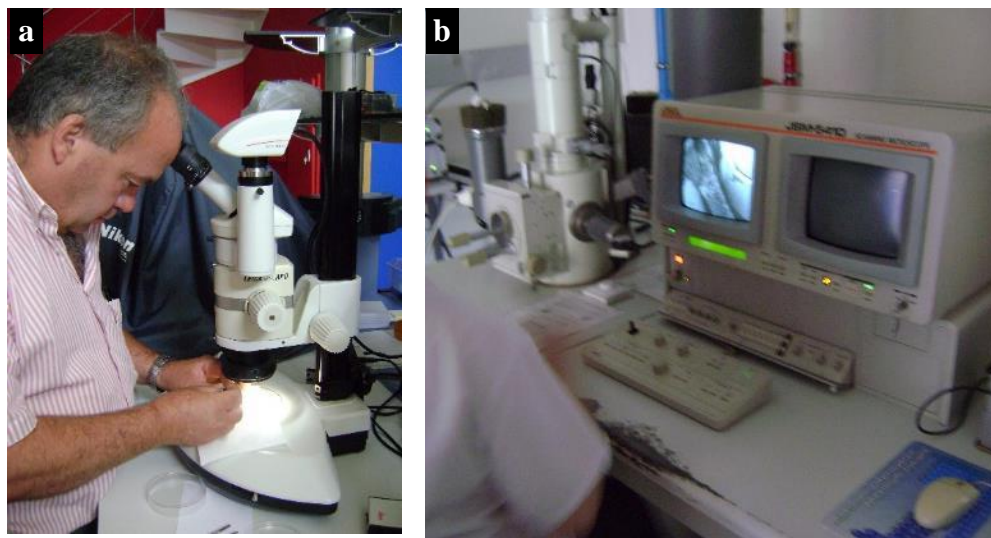
2.3. HISTOLOGÍA Y ANATOMÍA DE LOS ÓRGANOS REPRODUCTIVOS DE *CAPPARIS SPINOSA* L. SUBSP. *RUPESTRIS*

2.3.1. Introducción

Aunque existen abundantes estudios histológicos de los frutos y de las semillas de muchas especies, no se ha encontrado ningún estudio riguroso sobre la histología de estos órganos de *C. spinosa*, por lo que se ha realizado el estudio de las anteras, ovario, fruto y semillas.

2.3.2. Material y métodos

Para la realización de este estudio se ha utilizado un estereomicroscopio Leica modelo MZ APO con cámara fotográfica DFZ420 (Fotografía 2.3.1 a), y un microscopio electrónico de barrido (*Scanning Electron Microscopy*; SEM), JEOL modelo JSM6300 (Fotografía 2.3.1 b), ambos del Servicio de Microscopia Electrónica de la UPV, y un microscopio óptico del Servicio Central de Soporte a la Investigación Experimental (SCSIE) de la Universitat de València, Estudi General.



Fotografía 2.3.1. Lupa Leica modelo MZ APO (a). Microscopio electrónico de barrido JEOL modelo JSM6300 (b).

Para la observación en el microscopio SEM, las muestras fueron fijadas mediante criofijación y posteriormente montadas en soportes de cobre y cubiertas con oro, siendo analizadas a un voltaje de 15 kV (Universitat Politècnica de València 2012).

Para el microscopio óptico se han realizado preparaciones tanto en inclusión en resina LR-White, como en parafina. En la inclusión en resina LR-White se han seguido los siguientes pasos: Fijación con fijador Karnouski; Post fijación con osmin (2%); Deshidratación; Infiltración con la resina en graduaciones crecientes hasta llegar a resina al 100%; Polimerización en estufa a 60°C; Preparación del bloque y corte semifino a 2 μ con cuchilla de diamante Diatome en Ultracut Leica UC-6; Tinción con azul de toluidina (Mínguez, 2017, comunicación personal). En la inclusión parafina: Fijación; Deshidratación; Xilol; Parafina (Varios baños, con duración de 1 h cada paso); Orientación de la muestra, obtención de los bloques; Corte a 5 μ en micrótopo de parafina Leica RM-2125RT; Tinción con hematoxilina-eosina (Mínguez, 2017, comunicación personal).

2.3.3. Resultados y discusión

En la fotografía 2.3.2 se presentan las dos tecas de la antera (de aproximadamente 2 mm de longitud) en vistas lateral y frontal, además de una sección de la antera tras la antesis, en la que se observan granos de polen.



Fotografía 2.3.2. Vista lateral (a) y frontal (b) de la antera. Detalle de una sección de la misma tras la antesis (c).

En la fotografía 2.3.3 se presenta una sección longitudinal del ovario, de forma elipsoidal (5 mm de longitud), en el que se observan una multitud de óvulos (a), un detalle del ovario, en la que se observa el exocarpio, el mesocarpio, y varios óvulos unidos a la placenta (b), que es parietal, y un detalle en el que destaca la presencia de un óvulo, con su funículo que lo unía a la placenta, con el estilo y el estigma capitado (c).

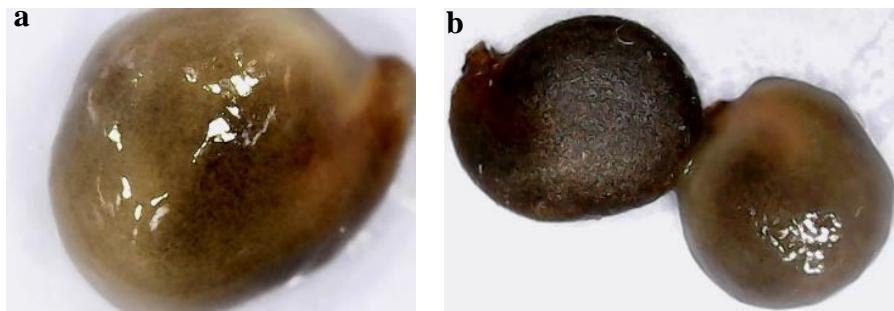


Fotografía 2.3.3. Sección longitudinal del ovario (a). Detalle del ovario, en la que se observa el exocarpio, el mesocarpio, y varios óvulos unidos a la placenta (b). Detalle de un óvulo, con su funículo, estilo y el estigma capitado (c).

En la fotografía 2.3.4 se presenta una sección transversal del fruto (de aproximadamente 25 mm de diámetro), un fruto inmediatamente después de la dehiscencia, y un detalle del mismo, en las que se observa el exocarpio, de color verde oscuro, el mesocarpio que presenta una gradación de color verde a crema, que engloba a las semillas a su vez rodeadas por el endocarpio, de aspecto gelatinoso, cuyo detalle se presenta en la fotografía 2.3.5, en la que se observa el endocarpio envolviendo totalmente a la semilla (a), y dos semillas, una con, y la otra sin el endocarpio (b).

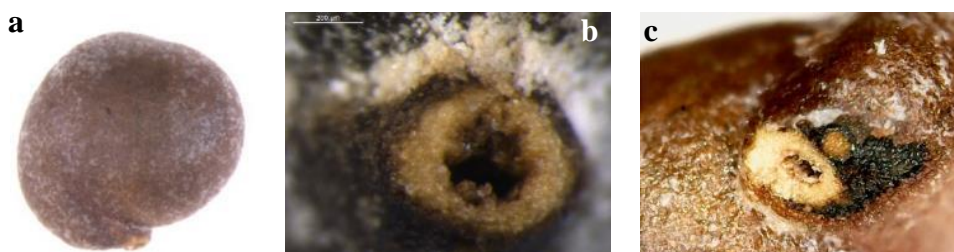


Fotografía 2.3.4. Sección transversal del fruto (a). Fruto inmediatamente después de la dehiscencia (b). Detalle de las semillas recubiertas del endocarpio (c).

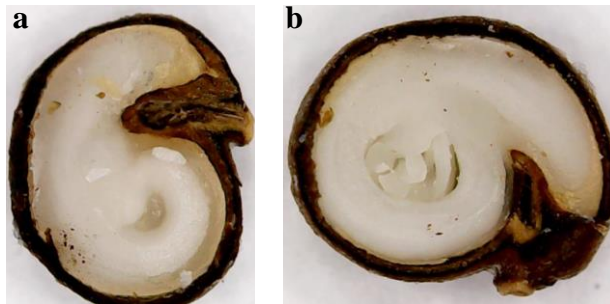


Fotografía 2.3.5. Endocarpio envolviendo totalmente a la semilla (a), y dos semillas, una con, y la otra sin endocarpio (b).

En la fotografía 2.3.6 se presenta una semilla (a), reniforme, de 3.3 x 3.3 mm, de color marrón; en la superficie externa se observa a una cicatriz redondeada, de la que sobresale un reborde de color más claro que el resto de la testa, que es el hilo (b). Muy próximo al hilo, como es característico de los óvulos campilótropos, se presenta, en este caso de modo casi inapreciable, el micrópilo (c). La sección longitudinal de la semilla permite observar el endospermo (Fotografía 2.3.7 a) y el embrión, con los cotiledones enrollados (Fotografía 2.3.7 b), así como la zona micropilar, el hilo y la hendidura existente junto al mismo.

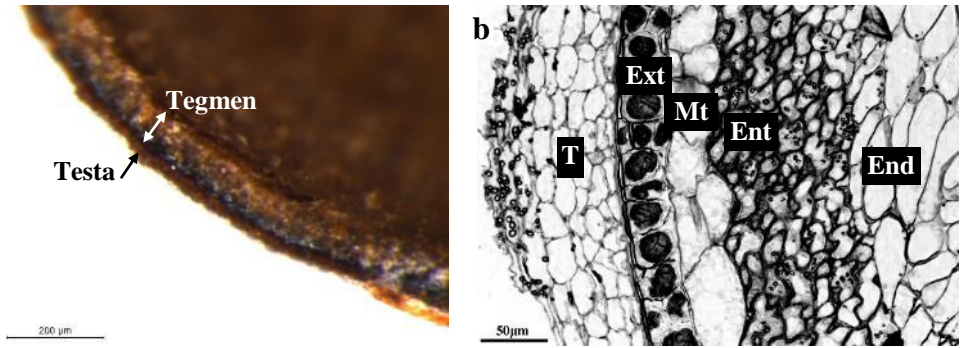


Fotografía 2.3.6. Semilla reniforme (a). Detalle del hilo (b). Detalle del hilo y del micrópilo (c).

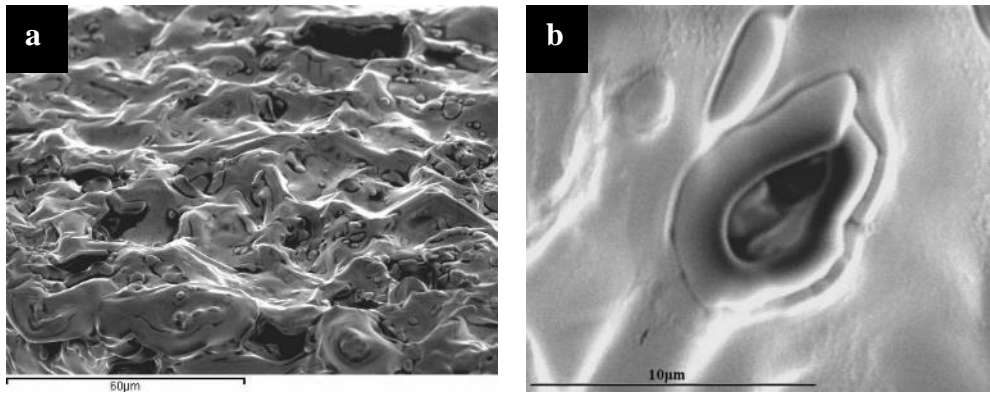


Fotografía 2.3.7. Sección longitudinal de una semilla, en la que se puede observar el endospermo (a) y el embrión (b), con sus cotiledones enrollados.

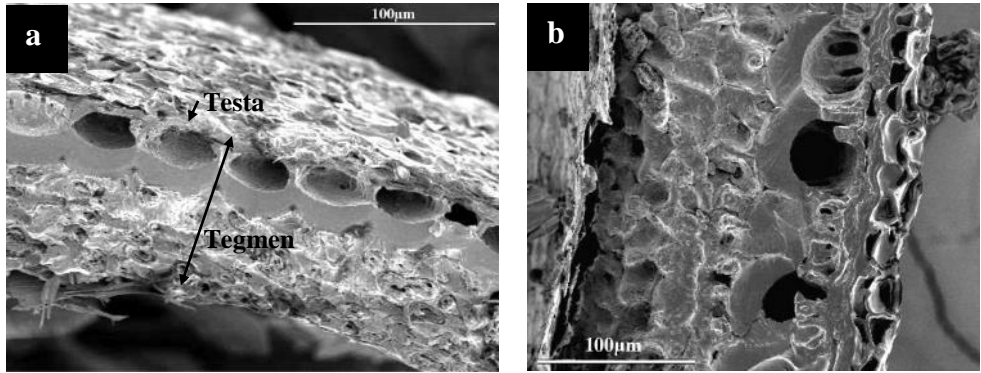
La semilla es bitécnica, de manera que la cubierta está formada por testa y tegmen. La testa está formada por 5-6 capas de células, y posee un espesor de aproximadamente 0,06-0.07 mm (Fotografía 2.3.8 b); la epidermis externa posee estomas (Fotografía 2.3.9 b). El tegmen tiene un espesor de 0.17-0.19 mm y consiste en un exotegmen formado por una capa de 1-2 células de espesor, con paredes muy lignificadas y engrosadas (Fotografía 2.3.8 a; capa de color negro), mesotegmen de 1-2 capas de células sin lignificar, y endotegmen fibroso y lignificado, formado por varias capas de células (Figura 2.3.8 b). Aparentemente en la hendidura (Figura 2.3.7) se presenta una discontinuidad del exotegmen (que constituye la capa de color negro), por lo que podría comportarse como una puerta de entrada de agua cuando las semillas se encuentran en un sustrato húmedo.



Fotografía 2.3.8. Detalles de la cubierta de las semillas (a y b). En b, T: testa, Ext: exotegmen, Mt: mesotegmen, Ent: endotegmen y End: endospermo



Fotografía 2.3.9. Epidermis externa (a) y detalle de un estoma (b)



Fotografía 2.3.10. Cubierta de la semilla, compuesta de testa y tegmen.

El embrión, que está rodeado por el endospermo (Fotografía 2.3.11 a), posee un hipocótilo largo y enrollado con apariencia de dos nudos (Fotografía 2.3.11 b); la radícula es corta y los cotiledones delgados y enrollados (Fotografía 2.3.11 c).



Fotografía 2.3.11. Embrión rodeado por el endospermo (a). Detalle del embrión (b). Detalle de los cotiledones (c).

Al tratar la semilla con el colorante sudán, que es un colorante “indiferente”, el endospermo se ha teñido de rojo (Fotografía 2.3.12), lo que indica que el colorante se ha disuelto en los lípidos, y por tanto que el endospermo es rico en lípidos.



Fotografía 2.3.12. Semilla teñida con colorante sudán.

La descripción de las cubiertas de las semillas de *C. spinosa* coincide con la realizada por Corner (1976) para las semillas del género *Capparis*.

2.3.4. Conclusiones

Se ha realizado la descripción histológica del ovario, fruto y semilla de *C. spinosa*, comprobándose que la cubierta es bitécnica, formada por testa y tegmen.

La discontinuidad de la capa de células con las paredes tangenciales engrosadas de la testa, que se observa en la hendidura, podría constituir una puerta de entrada de agua cuando las semillas se encuentran en un sustrato húmedo, hipótesis que se confirma en el apartado 2.5 de esta tesis doctoral.

2.4. PODER GERMINATIVO DE LAS SEMILLAS DE LAS SUBESPECIES *RUPESTRIS* Y *SPINOSA* DE *CAPPARIS SPINOSA* L.

2.4.1. Introducción

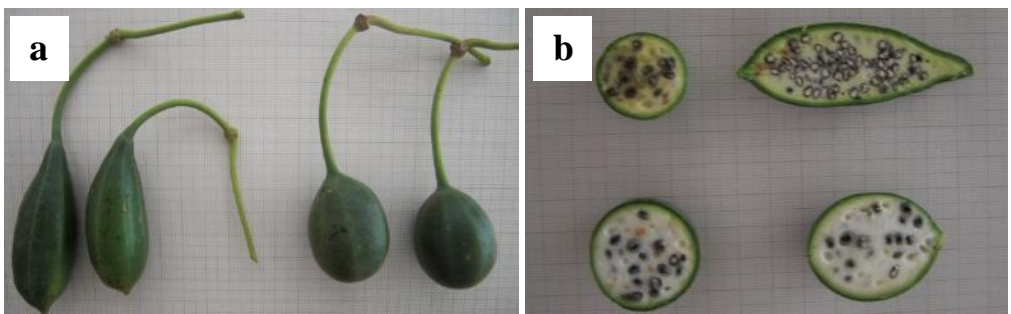
El objetivo de este experimento es estudiar el poder germinativo de las semillas de las dos subespecies más importantes de *C. spinosa* en España, la subsp. *rupestris* y la subsp. *spinosa*, para lo cual se utilizaron semillas propias, producidas en la parcela de experimentación (39° 38'N, 0° 22' W). Existen diferencias importantes en la morfología de las dos subespecies, tanto a nivel de planta (Fotografías 2.4.1 y 2.4.2), como de frutos (Fotografías 2.4.1 b, 2.4.2 b y 2.4.3). Además, se adquirieron en el comercio, semillas de las que no se tenía información de la subespecie a la que pertenecían, con el objetivo de tras el ensayo de germinación, seguir el crecimiento y desarrollo de las plantas, e identificarlas en base a sus características morfométricas.



Fotografía 2.4.1. Planta de *C. spinosa* subsp. *rupestris* (a) y detalle de la parte apical de una rama en plena producción (b).



Fotografía 2.4.2. Planta de *C. spinosa* subsp. *spinosa* (a) y detalle de la parte apical de una rama en plena producción (b).



Fotografía 2.4.3. Frutos de las subespecies *rupestris* y *spinosa* de *C. spinosa*, enteros (a) y sección de los mismos (b). Los frutos de la subsp. *rupestris* (*spinosa*) son los situados a la izquierda (derecha) en la fotografía a y en la parte superior (inferior) de la fotografía b.

2.4.2. Material y métodos

El ensayo se realizó de marzo a julio de 2015 utilizando semillas propias y semillas adquiridas en el comercio. Las semillas propias se recolectaron durante la segunda semana de octubre de 2013, de plantas

cultivadas en la parcela de experimentación, e identificadas como *C. spinosa* subsp. *rupestris* y *C. spinosa* subsp. *spinosa* (Flora Ibérica, 2005). Las plantas procedían de estaquillas de tallo enraizadas, procedentes a su vez de plantas cultivadas en Lliria (Valencia) y Llubí (Mallorca) respectivamente.

Las semillas comerciales pertenecían a la Colección F. (R. S.A.), bajo la denominación de Alcaparras, *Capparis spinosa*, figurando en el envase la fecha de recolección (febrero de 2012) y de caducidad (febrero de 2016).

Los procesos de la recolección, separación, limpieza y secado de las semillas, así como los ensayos de viabilidad de germinación, se realizaron según se ha indicado en 2.2.1, 2.2.2, y 2.2.3. Antes de realizar el ensayo de germinación se determinó la viabilidad de las semillas mediante el ensayo al tetrazolio (Moore, 1985; Leist *et al.*, 2003); de igual manera, tras la realización del ensayo de germinación se determinó la viabilidad de las semillas no germinadas. El ensayo de germinación se mantuvo durante 170 días.

2.4.3. Resultados y discusión

La viabilidad de las semillas comerciales antes de realizar el ensayo de germinación, fue nula. Este resultado es, en principio, sorprendente, puesto que según se indica en su envase las semillas se recolectaron en febrero de 2012, y por tanto tenían 3 años de edad, por lo que su viabilidad debía ser todavía aceptable, y de hecho la fecha de caducidad indicada en el envase era febrero de 2016. El test de viabilidad se repitió con semillas comerciales de otro envase, volviendo a dar un resultado nulo. Por otra parte, no existieron diferencias significativas ($P \leq 0,05$) en la viabilidad de las semillas de los lotes de semillas de las subespecies *rupestris* (72.5%) y *spinosa* (75.0%) antes de realizar el ensayo de germinación. Los dos valores, aunque aceptables, son ligeramente inferiores a los que cabía

esperar, según su edad (aproximadamente 1.5 años) y los resultados obtenidos en el apartado de la longevidad (2.6.2).

La germinación de las semillas comerciales fue nula, lo que resulta evidente puesto que su viabilidad fue nula. No obstante, al igual que el test de viabilidad, también se repitió el ensayo de germinación con semillas de otro envase, obteniéndose de nuevo una germinación nula, y, por tanto, al no cumplirse la hipótesis de normalidad, este resultado no se incluyó en el análisis estadístico (Tabla 2.4.1).

La función logística resulta adecuada para analizar la germinación de los dos lotes de semillas utilizados en este estudio ($R^2 \geq 0.98$ y $P \leq 0.05$), tal y como ha ocurrido en anteriores estudios realizados sobre la germinación de semillas de alcaparra (Pascual *et al*, 2003; Pascual *et al*, 2009), lo que permite el uso de los parámetros A , β y k .

En la figura 2.4.1 se presenta el modelo logístico ajustado a la germinación acumulada de las semillas de las dos subespecies, con y sin aplicación de AG₃ al sustrato (papel de filtro).

Se observa que las semillas de la subespecie *rupestris* comenzaron a germinar antes que las de la subespecie *spinosa* y obtuvieron un mayor valor de la germinación máxima, tanto con la aplicación de AG₃ como sin su aplicación. No obstante, convendría destacar que las semillas de la subespecie *spinosa* (y en menor medida de la subespecie *rupestris*), no tratadas con AG₃, germinaron muy tarde (comenzando su germinación prácticamente cuando se debería haber terminado el ensayo), por lo que probablemente hubieran seguido germinando e incrementando su bajo porcentaje de germinación si el ensayo se hubiera prolongado, aunque, por otra parte, un ensayo tan largo no resultaría factible en la práctica.

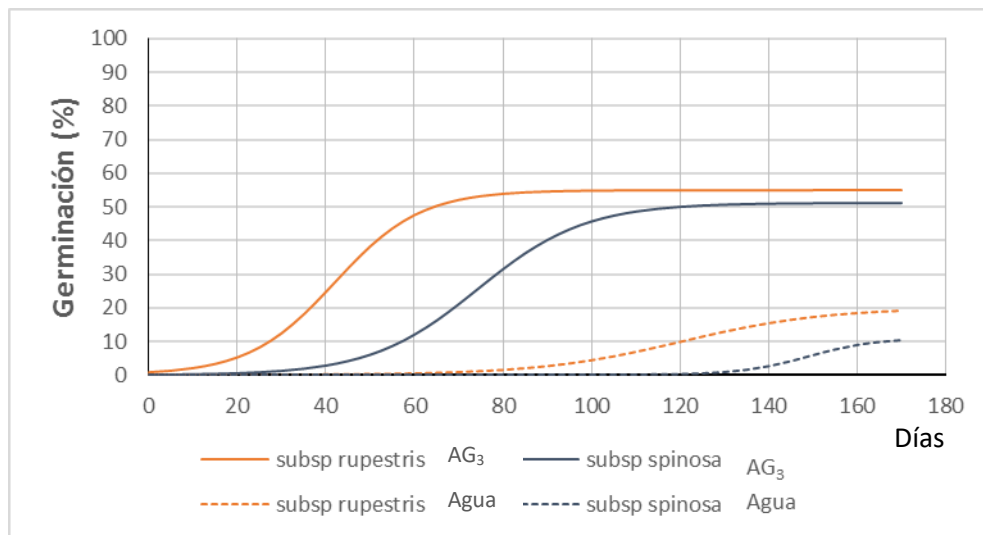


Figura 2.4.1. Modelo logístico ajustado de germinación acumulada de las semillas de las subespecies *rupestris* y *spinosa*, con y sin adición de AG₃ al sustrato. Valores medios de cuatro repeticiones.

En la tabla 2.4.1 se presenta el análisis estadístico del porcentaje de germinación acumulada (G , %) y de los valores medios de los parámetros A (%), t_{50} (d) y $k/2$ (d^{-1}) obtenidos en el ensayo de germinación. El efecto de la subespecie y de la adición de AG₃ tuvieron una influencia significativa ($P \leq 0,01$) en el valor de G (y de A), explicando respectivamente el 3,0 y el 93,6 %, de la variabilidad total. Los valores de G y de A fueron mayores ($P \leq 0,05$) en la subespecie *rupestris* que en la subespecie *spinosa*, y el aporte de AG₃ al sustrato incrementó ambos valores ($P \leq 0,05$) con respecto al control. Aunque la interacción de los dos factores analizados no resultó significativa ($P \leq 0,05$), se presentan los valores de la misma por considerarse interesantes (Tabla 2.4.2).

Tabla 2.4.1. Efecto de la subespecie (subsp. *rupestris* y subsp. *spinosa*) y de la adición de AG₃ al sustrato, en el porcentaje de la germinación acumulada (G, %), la germinación máxima (A, %), y los parámetros de germinación t₅₀ (d) y k/2 (d⁻¹), de las semillas de la especie *C. spinosa*.

	G	A	t ₅₀	k/2	
Subespecie					
	<i>rupestris</i>	37.0 a	37.66 a	80.91 b	0.041
	<i>spinosa</i>	30.0 b	30.98 b	112.68 a	0.054
AG ₃					
	Agua	14.0 b	15.51 b	134.57 a	0.049
	AG ₃	53.0 a	53.13 a	59.02 b	0.046
Análisis de la Varianza					
Factores (grados de libertad)	% Suma de cuadrados				
Subespecie (1)	3.0 **	3.0 **	14.8 **	0.4 NS	
AG ₃ (1)	93.6 **	93.8 **	83.5 **	11.1 NS	
Subespecie x AG (1)	0.6 NS	0.5 NS	0.0 NS	3.7 NS	
Residual (12)	2.8	2.7	1.7	84.8	
Desviación estándar (+)	4.39	4.13	7.55	0.02	

Letras diferentes en una columna indican diferencias significativas con ($P \leq 0.05$). NS: No significativo. ** nivel de significación $p \leq 0.01$. (+) La desviación estándar se ha calculado como la raíz cuadrada del cuadrado medio residual.

Resultados similares se obtuvieron con respecto al tiempo necesario para alcanzar el 50 % de la germinación ($t_{50} = \beta/k$, d), resultando significativos ($P \leq 0.01$) los dos factores, pero no la interacción de los mismos, explicando respectivamente el 14,8 % y el 83,5 % de la variabilidad total. La subespecie *rupestris* presentó una germinación más rápida (menor t₅₀) que la subespecie *spinosa*, tanto con aporte de AG₃ (42,4 vs. 75.7 días) como sin su aporte (119,7 vs. 149.7 días). El AG₃ redujo el valor de t₅₀ ($P \leq 0,05$), con una media de 59,0 días con AG₃ y 134,6 días sin AG₃. Ni la subespecie, ni la utilización del AG₃, afectaron ($P \leq 0,05$) a la velocidad de germinación. La interacción de los mismos tampoco resultó significativa ($P \leq 0.05$).

Tabla 2.4.2. Análisis de las interacciones de los análisis de la varianza de la tabla 2.4.1. Efecto de la subespecie (subsp. *rupestris* y subsp. *spinosa*) y de la adición de AG₃ al sustrato, en el porcentaje de la germinación acumulada (G, %), la germinación máxima (A, %), y los parámetros de germinación t₅₀ (d) y k/2 (d⁻¹), de las semillas de la especie *C. spinosa*.

	G	A	t ₅₀	k/2
Subespecie. x AG ₃				
<i>rupestris</i> - Agua	19.0	20.15	119.45	0.031
<i>rupestris</i> - AG ₃	55.0	55.17	42.37	0.052
<i>spinosa</i> - Agua	9.0	10.86	149.69	0.066
<i>spinosa</i> - AG ₃	51.0	51.10	75.67	0.041
LSD (p ≤ 0.05)	4.78	4.50	8.23	0.02

Del análisis de los valores del porcentaje de viabilidad de las semillas no germinadas al finalizar el ensayo de germinación se constata que la viabilidad de estas semillas, a cuyo sustrato se había aportado AG₃, fue nula en las dos subespecies, es decir que todas las semillas viables, y por tanto con poder germinativo, habían germinado durante el ensayo de germinación. En cambio, las semillas que no habían germinado, pero cuyo sustrato no contenía AG₃, todavía presentaban una notable capacidad de germinación (viabilidad), resultando mayor la viabilidad de las semillas de la subespecie *spinosa* (47.5%) que las de la subespecie *rupestris* (42.5%), debido probablemente a que estas últimas habían obtenido un mayor porcentaje de germinación en el ensayo. Al no cumplirse la hipótesis de normalidad no es posible realizar el análisis de la varianza.

2.4.4. Conclusiones

La viabilidad, y consecuentemente la germinación del lote de semillas comercial ensayado, es nula.

No existen diferencias en la viabilidad de las semillas de los lotes de las subespecies *rupestris* y *spinosa*.

La función logística resulta adecuada para analizar la germinación de los lotes de semillas de las dos subespecies.

Las semillas de la subespecie *rupestris* germinan antes y en mayor proporción que las de la subespecie *spinosa*.

La adición de AG₃ al sustrato adelanta y aumenta la germinación de las semillas de las dos subespecies, consiguiendo que germinen todas las semillas viables.

Al finalizar el ensayo de germinación de las semillas en sustrato sin AG₃, todavía quedan semillas viables sin haber germinado, aunque la realización de ensayos tan largos no resultaría factible en la práctica.

2.5. ANÁLISIS DE LA ABSORCIÓN DE AGUA POR PARTE DE LAS SEMILLAS DE *CAPPARIS SPINOSA* L. SUBSP. *RUPESTRIS*

2.5.1. Introducción

El concepto de semillas “duras” se ha utilizado habitualmente para definir a las semillas que no han absorbido agua tras ser puestas a germinar (Besnier, 1989), pero también en referencia a la dureza de la semilla respecto al tacto, existiendo una importante ambigüedad al respecto (Orozco-Segovia *et al.*, 2007).

Las semillas con una cubierta impermeable presentan latencia física (LF; Baskin y Baskin, 2004), siendo conocido que este tipo de latencia ocurre en 16 familias de angiospermas, pero no ocurre en gimnospermas (Baskin *et al.* 2000); estos autores asocian, en todos los casos, la LF a una/s capa/s de células en empalizada (macroesclereidas) impermeable/s al agua.

La única manera de determinar si la cubierta de una semilla dura (respecto al tacto) es permeable o impermeable al agua, es realizar ensayos de imbibición. Si en estos ensayos la semilla es incapaz de embeber agua, se considera que la semilla presenta LF. Cuando la escarificación (mecánica, química, térmica, etc.) ha mejorado la germinación de una semilla se ha considerado generalmente que ésta presenta LF, lo que ha conducido a confusión, puesto que no es necesariamente cierto.

Según el diccionario de la lengua española (RAE, 2017) imbibición es la acción y el efecto de embeber. Según este diccionario, dicho de un sólido, embeber es absorber un líquido. En el mundo de las semillas se denomina imbibición a la absorción inicial de agua por parte de la semilla seca a partir del medio circundante (Bewley y Bradford, 2006), y más concretamente a la primera fase de la absorción de agua por parte de la semilla (Besnier, 1989).

El objetivo de este apartado de la tesis doctoral es determinar el efecto de la cubierta de las semillas de *C. spinosa* L. subsp. *rupestris* en la absorción de agua (imbibición en sentido amplio) por parte de las mismas, analizando su posible impermeabilidad, lo que implicaría la presencia de LF. Para analizar la imbibición se han realizado cuatro estudios, en los que se analiza la capacidad de imbibición de las semillas, a nivel individual y de lote, la imbibición de semillas escarificadas, y la imbibición en las cubiertas y en el endospermo de las semillas. Previamente se ha estudiado el procedimiento a seguir en el secado de estas semillas para la determinación de su humedad. Las normas ISTA (ISTA, 2007) establecen que algunas semillas con cubierta dura deben ser molidas o troceadas antes de proceder a su secado en la determinación de su humedad. Las citadas normas no indican si las semillas de *C. spinosa* deben ser, o no, molidas o troceadas, lo que podría ser debido a que no es necesario, o a que, al ser un cultivo menor [Reglamento (UE) 752/2014; DOUE], no se hayan realizado estudios al respecto, aunque existan abundantes estudios sobre la germinación de sus semillas. Se planteó un ensayo con el objetivo de conocer si existen diferencias en los valores determinados de la humedad de las semillas troceadas tras la imbibición y antes de proceder a su secado, con respecto a las semillas control (no troceadas), lo que implicaría que debería incluirse a las semillas de *C. spinosa* en la lista de las semillas que deben ser troceadas antes de proceder a su secado (Tabla 9.A de las normas ISTA, ISTA, 2007).

2.5.2. Establecimiento del procedimiento a seguir en el secado de las semillas de alcaparra para la determinación de su humedad

2.5.2.1. Material y métodos

En abril de 2016, seis grupos de 200 semillas (del lote de semillas recolectadas en la cuarta semana de septiembre de 2010) se mantuvieron a remojo en agua durante 0, 24, 48, 72, 96 o 192 h (0, 1, 2, 3, 4 o 8 d) en sus

respectivos vasos de precipitado. Transcurrido el correspondiente periodo, las 200 semillas de cada grupo fueron secadas superficialmente al ser envueltas durante 10 s en papel absorbente de laboratorio (papel bobina Tracel).

A continuación, las semillas fueron separadas al azar, en ocho subgrupos de 25 semillas. Todas y cada una de las semillas de 4 subgrupos (correspondientes a 4 repeticiones) fueron partidas en cuatro trozos, y las semillas de los otros 4 subgrupos (correspondientes a 4 repeticiones) se dejaron intactas. Seguidamente se pesó cada subgrupo de semillas en una balanza analítica de laboratorio (Sartorius, modelo B 120 S; resolución = 0.1 mg). A continuación, se secó cada subgrupo de 25 semillas, a 103 °C durante 24 h (ISTA, 2007) en estufa de aire forzado (Selecta, 297B), pesándose de nuevo tras el secado.

La humedad de las semillas se presenta como contenido en agua de la semilla (% respecto al peso fresco; ISTA, 2007).

$$\text{Humedad (\%)} = \left(\frac{\text{Peso fresco} - \text{Peso seco}}{\text{Peso fresco}} \right) * 100 \quad (\text{ec. 2.5.1})$$

2.5.2.2. Resultados y discusión

En la figura 2.5.2.1 se presenta la evolución, durante el remojo, de los valores determinados de la humedad de las semillas, según su troceado o no. Se observa que, aunque ambos parámetros alcanzaron valores próximos a los máximos tras el remojo de dos días, su valor se incrementó ligeramente hasta los 8 días.

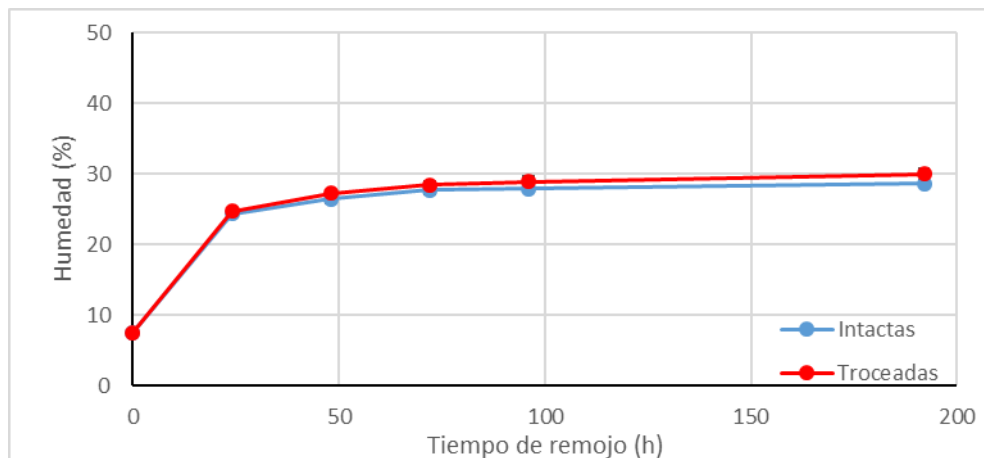


Figura 2.5.2.1. Evolución de la humedad (%) de las semillas, intactas y troceadas, durante el remojo. Valores medios de 4 repeticiones. Las barras verticales representan el error estándar.

Se observa (Figura 2.5.2.1) que los valores de la humedad de las semillas troceadas e intactas fueron muy similares. En la tabla 2.5.2.1 se presentan los valores correspondientes a periodos de remojo de 96 y 192 h (4 y 8 d), observándose que el troceado no influyó significativamente ($P \leq 0.05$) en el valor de humedad de la semilla, y por tanto que la semilla de alcaparra no necesita ser troceada para la determinación de su humedad, por lo que no debería incluirse en tabla 9.A de las normas ISTA (ISTA, 2007) en la que figuran las semillas que deben ser troceadas antes de proceder a su secado.

Tabla 2.5.2.1. Efecto del troceado de las semillas, tras el remojo de las mismas durante 96 o 192 horas, en el valor determinado de la humedad (%) de las semillas.

	96 horas	192 horas
Estado de las semillas		
Intactas	27.91	28.60
Troceadas	28.94	29.99
Análisis de la Varianza		
Parámetros (grados de libertad)	% suma de cuadrados	
Estado (1)	19.56 NS	10.92 NS
Residual (6)	80.44	89.08
Desviación estándar (+)	1.21	2.03

Letras diferentes en una columna indican diferencias significativas con ($P \leq 0,05$) según el test LSD. g.l.: grados de libertad; NS: no significativo. (+) La desviación estándar se ha calculado como la raíz cuadrada del cuadrado medio residual.

2.5.2.3. Conclusiones

Las semillas de alcaparra no necesitan ser troceadas antes del secado en la determinación de su humedad.

2.5.3. Análisis de la absorción de agua de las semillas individuales

2.5.3.1. Material y métodos

Este estudio consta de dos experimentos, realizados ambos en 2016, el primero en el mes de mayo, con semillas procedentes de frutos recolectados en la cuarta semana de septiembre de 2010, y el segundo en el

mes de julio, con semillas recolectadas en la cuarta semana de septiembre de 2014, es decir, que las semillas tenían, aproximadamente, una edad de 5 y 2 años, respectivamente.

En los dos primeros experimentos, para determinar la absorción (imbibición en sentido amplio) de agua por parte de las semillas, se pesaron de manera individual diez semillas antes de ponerlas a remojo en agua destilada, colocando cada semilla en un vaso de precipitado de 50 mL, con una columna de agua de aproximadamente 10 mm. Cada semilla se pesó cada hora, durante las primeras 48 h, y a partir de entonces y durante las 48 h siguientes se pesaron cada 4 h, y transcurrido este periodo se pesaron cada 12 h, hasta finalizar el ensayo (480 h). El ensayo se mantuvo durante este periodo (20 d) debido a que en un ensayo previo se había detectado la imbibición de un colorante a partir de los 16 días de remojo (datos no presentados). Las pesadas se realizaron con una balanza analítica de laboratorio (Sartorius, modelo B 120 S) con una resolución de 0,1 mg. Antes de cada pesada las semillas fueron secadas superficialmente, siguiendo siempre el mismo procedimiento: la semilla se sacaba del vaso con una pinza, se envolvía en papel absorbente de laboratorio (papel bobina Tracel) durante 10 s, y a continuación se pesaba. Tras la pesada se ponía de nuevo la semilla a remojo en el vaso de precipitado.

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

$$\text{Imbibición (\%)} = \left(\frac{\text{Peso fresco}_i - \text{Peso fresco}_{\text{inicial}}}{\text{Peso fresco}_{\text{inicial}}} \right) * 100 \quad (\text{ec. 2.5.2})$$

Al ser el agua incolora, el proceso de imbibición no se detecta visualmente, por lo que paralelamente al segundo experimento se pusieron semillas a remojo con tres colorantes (básicos) utilizados habitualmente en

histología vegetal, azul de metileno, azul de toluidina y rojo neutro (Megías, 2015).

2.5.3.2. Resultados y discusión

En la figura 2.5.3.1, correspondiente al primer experimento, se observa una notable imbibición por parte de las semillas hasta transcurridas 24 h, seguida de un ligero incremento de la misma hasta las 48 h, a partir de las cuales la imbibición se mantuvo prácticamente constante. Se observa una clara diferencia entre la imbibición correspondiente a los valores máximos de las diferentes semillas (del 27 al 36%).

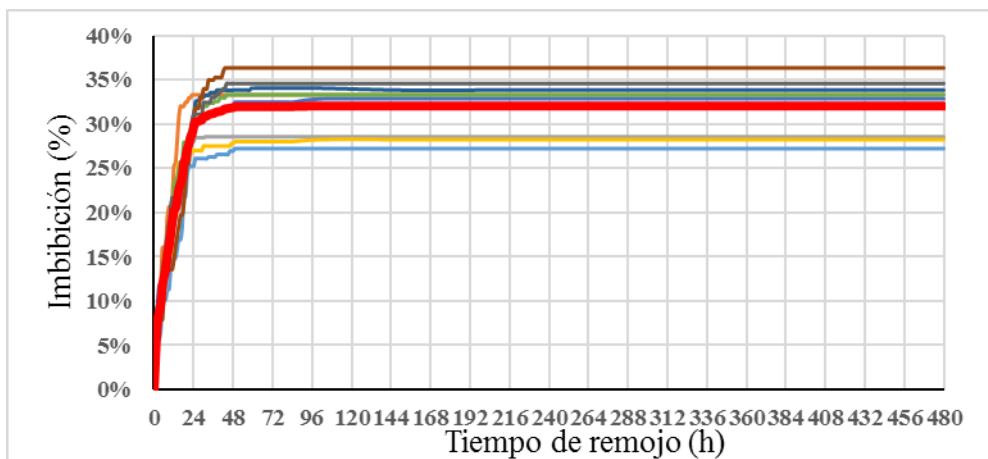


Figura 2.5.3.1. Evolución de la Imbibición de 10 semillas de manera individualizada (líneas finas) y valor medio de las mismas (línea gruesa). Experimento 1, realizado con semillas de 2010.

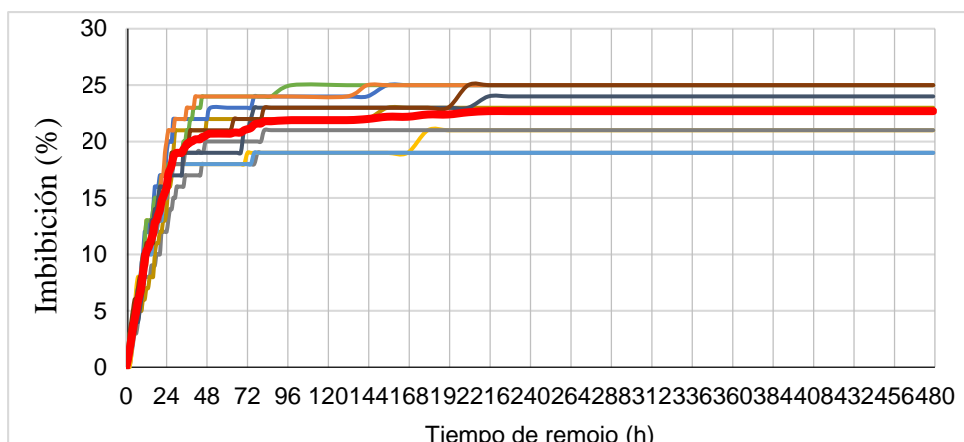


Figura 2.5.3.2. Evolución de la Imbibición de 10 semillas de manera individualizada (líneas finas) y valor medio de las mismas (línea gruesa). Experimento 2, realizado con semillas de 2014.

En el segundo experimento, la imbibición de agua por parte de las semillas secas puestas a remojo aumentó inicialmente con rapidez (0,7% por hora), durante las primeras 28 horas, alcanzando valores cercanos al 19%, reduciéndose a partir de entonces la tasa de imbibición hasta las 78 horas (0,06% por hora) y estabilizándose prácticamente a partir de entonces, detectándose únicamente un ligero incremento del valor medio hasta las 192 h (Figura 2.5.3.2). Se constata una mayor variabilidad en la imbibición de las semillas del experimento 2, que son más jóvenes (2 años) que las del experimento 1, que son más viejas (5 años).

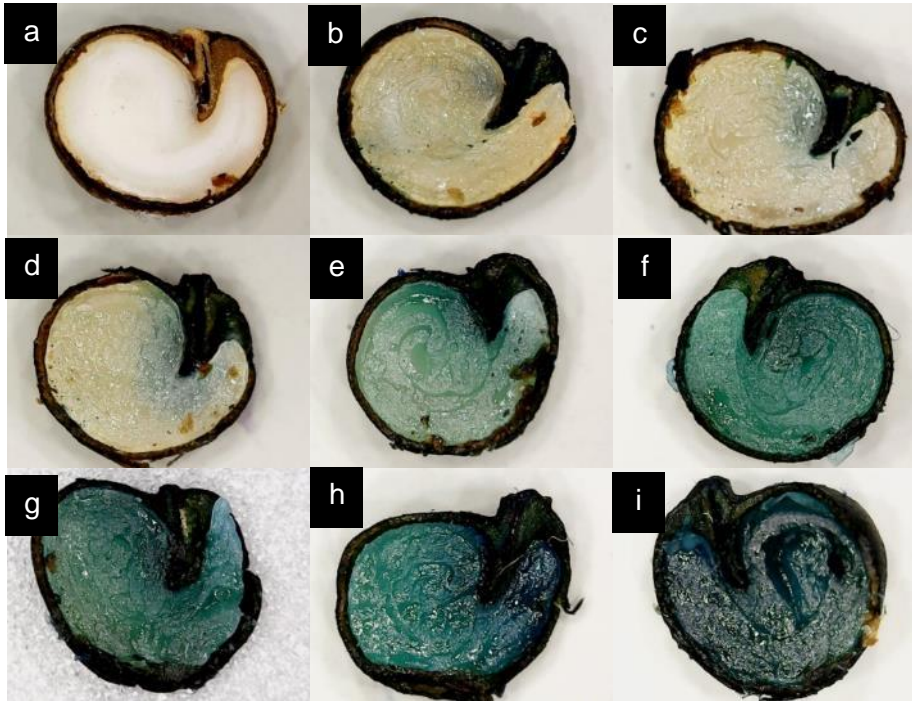
En los dos experimentos se observan claramente dos fases en la absorción de agua por parte de las semillas, coincidiendo con las dos primeras fases (que tienen lugar antes de la emergencia de la radícula) del modelo trifásico de absorción de agua en la germinación de las semillas (Bewley y Black, 1994; Hartmann *et al.*, 2014; Figura 2.1). La duración de la primera fase fue de 48 h en el primer experimento y de 96 h en el segundo.

La absorción de agua por parte de la semilla está determinada por el gradiente del potencial hídrico entre el medio (el agua en este caso en el que las semillas están a remojo) y la semilla. Inicialmente el potencial mátrico de las semillas secas es muy bajo, por lo que el agua se absorbe en la superficie seca de la cubierta (en este caso la testa), en las paredes de las células y en los compuestos poliméricos de reserva (fundamentalmente proteínas). Cuando la superficie de la cubierta de las semillas, que inicialmente estaba seca, se hidrata, el potencial mátrico de las semillas es casi nulo, por lo que la absorción de agua se debe fundamentalmente al gradiente entre el potencial osmótico de las semillas y los potenciales osmótico y de presión del medio (Bewley y Bradford, 2006). En este caso la columna de agua sobre las semillas tenía una altura aproximada de 10 mm.

Se observan diferencias importantes en los valores máximos de imbibición correspondientes a las distintas semillas (del 19 al 25% en el primer experimento y del 27 al 36% en el segundo), lo que no resulta extraño porque no todas las semillas crecieron y maduraron en las mismas condiciones ambientales (aunque todas las semillas utilizadas correspondieran a frutos cosechados en la cuarta semana de septiembre, de 2010 o de 2014), siendo conocida la importancia del estado de la planta y de las condiciones ambientales durante la maduración de las semillas (2.1.2; 2.1.3.3). La estabilización de la imbibición se obtuvo a las 48 h de remojo en el primer experimento y aproximadamente a las 192 h en el segundo. Los mayores valores de absorción de agua y el menor tiempo necesario para alcanzar los valores máximos de absorción obtenidos en el primer experimento, puede deberse al deterioro de la cubierta (testa e hilo, a través del cual se inicia la imbibición), que puede producirse con el envejecimiento de las semillas durante el almacenamiento (Walters, 2006). El deterioro de las cubiertas, como parte del deterioro general de las semillas, es probablemente, una de las causas de la disminución del porcentaje de germinación observado con el envejecimiento de las semillas de *C. spinosa* (Orphanos, 1983; Pascual *et al.*, 2006; Walters, 2006). Dada la variabilidad en el período necesario para la estabilización de la humedad de la semilla, dependiendo del lote de las

semillas utilizadas, se recomienda prolongar la duración del remojo hasta las 192 h (8d).

En el proceso de imbibición se forma un frente de humedad, de modo que no toda la semilla se humedece simultáneamente (Bewley y Black, 1994). En la fotografía 2.5.3.3 se presenta la evolución diaria del frente obtenido tras permanecer las semillas a remojo en el colorante azul de metileno, que fue el único que dio un resultado positivo. Se observa que el colorante penetró inicialmente por el hilo, siguiendo por el “canal de agua” [*water channel* (Orozco-Segovia *et al.*, 2007)] llegó a la zona chalazal, a través de la cual penetró en el endospermo y avanzó progresivamente hasta colorear completamente el embrión, lo que ocurrió a los 8 días de remojo con este colorante. Tal y como se puede observar en la figura 2.5.3.3b es evidente que el colorante ya penetró a través del hilo el primer día de remojo, pasando por el “canal de agua” al endospermo, a través de la zona chalazal, tiñendo los tejidos más cercanos a ésta. Se puede observar que a partir de entonces aumentó de manera gradual la superficie de tejido teñido, mostrándose siempre una coloración más oscura en la región chalazal. En las imágenes del cuarto/quinto día ya se evidencia una tinción completa pero tenue, alcanzándose la saturación de la zona chalazal y de la radícula al séptimo día, y de la totalidad del embrión, al octavo día.



Fotografía 2.5.3.1. Evolución diaria de la tinción con azul de metileno. Semilla antes de la imbibición (a); tras el remojo durante el número de días indicado: 1 (b); 2 (c); 3 (d); 4 (e); 5 (f); 6 (g); 7 (h); 8 (i).

2.5.3.3. Conclusiones

En el remojo y en la germinación de las semillas de *C. spinosa* subsp. *rupestris*, la absorción inicial del agua por parte de las mismas (previa a la emergencia de la radícula), presenta las dos primeras fases del modelo típico trifásico de absorción de agua en la germinación de las semillas.

La estabilización de la imbibición depende de las características de las semillas, oscilando entre 48 y 192 h en los lotes ensayados, por lo que se aconseja prolongar el ensayo de imbibición de las semillas hasta los 8 días.

Las cubiertas de las semillas, consideradas en sentido amplio (incluyendo el hilo), no son impermeables al agua, permitiendo la absorción de la misma, al ser puestas a remojo

El azul de metileno es el único colorante de los utilizados que ha dado resultado positivo.

La imbibición del colorante se produce a través del hilo, por el “canal de agua” llega a la zona chalazal, a través de la cual penetra en el endospermo y avanza progresivamente hasta colorear completamente el embrión.

2.5.4. Análisis de la absorción de agua de las semillas a nivel de lote

2.5.4.1. Introducción

Con el objetivo de analizar la absorción de agua de las semillas a nivel de lote, se realizó el presente estudio que consta de dos experimentos. El primero realizado con una metodología similar a la presentada en 2.5.3, pero utilizando repeticiones de 25 semillas en lugar de semillas individuales.

El segundo experimento se ha planteado a la vista de los resultados obtenidos en el primero, con el objetivo de dilucidar si la imbibición que se produce durante el remojo es similar a la que se produce durante el proceso de germinación, cuando las semillas están en el sustrato húmedo.

2.5.4.1. Material y métodos

En el primer experimento se estudió la evolución de la imbibición de las semillas puestas a remojo durante 8 días. Las semillas pertenecían a dos lotes, uno propio, correspondiente a semillas recolectadas en la cuarta semana de septiembre de 2010, y del que se tenía constancia de su elevada viabilidad (90 %) y aceptable capacidad de germinación (56.4 %). Las otras

semillas pertenecían a un lote comercial (n° 114509; con “fecha de último análisis” agosto de 2014 y “fecha de validez” agosto de 2018), del que se tenía constancia de su baja viabilidad (19.5 %) y nula germinación (0-0.5 % obtenida en laboratorio en un estudio realizado en paralelo, y 0 % obtenida en semillero, según información del distribuidor de la semilla). En el mes de marzo de 2016, seis grupos de 100 semillas de cada lote se mantuvieron a remojo en agua del grifo durante 0, 1, 2, 3, 4 o 8 d (0, 24, 48, 72, 96 o 192 h) en sus respectivos vasos de precipitado, de 50 mL, con una columna de agua de aproximadamente 50 mm. Transcurrido el correspondiente periodo, las 100 semillas de cada grupo fueron secadas superficialmente, envueltas durante 10 s en papel absorbente de laboratorio (papel bobina Tracel). Seguidamente, las 100 semillas fueron separadas al azar en cuatro subgrupos de 25 semillas (correspondientes a 4 repeticiones). A continuación, se pesó cada subgrupo de semillas en una balanza analítica de laboratorio (Sartorius, modelo B 120 S; resolución = 0.1 mg) y se procedió a su secado, a 103 °C durante 24 h (ISTA, 2007) en estufa de aire forzado (Selecta, 297B), pesándose de nuevo tras el secado. Se presenta la imbibición (2.4.5.2) y la humedad de las semillas [% respecto al peso fresco; (2.4.5.1), ISTA, 2007].

El segundo experimento se ha realizado en marzo de 2017, utilizando semillas propias del mismo lote utilizado en el primer experimento, y siguiendo idéntico procedimiento, analizando la imbibición producida en las semillas durante el ensayo de germinación, con el método BP (ISTA, 2007) en placa de Petri (apartado 2.2.3) a temperatura ambiente, en relación a la producida durante el remojo de las semillas en sendas columnas de agua, de 10 y 100 mm.

2.5.4.2. Resultados y discusión

En la figura 2.5.4.1 se presentan los valores de la imbibición acumulada, las curvas ajustadas al modelo cuadrático y las ecuaciones correspondientes, obtenidas a partir de los valores medios de la imbibición de las semillas, tanto del lote comercial como de las semillas propias. En ambos casos el coeficiente de determinación (R^2) supera el valor de 0.95, y resulta estadísticamente significativo ($P \leq 0.01$). Se observa que a partir del tercer-cuarto día, la imbibición es poco importante (semillas propias) o prácticamente nula (semillas comerciales), lo que coincide totalmente con los resultados obtenidos en el segundo experimento del estudio de imbibición realizado con semillas individuales (apartado 2.5.3.2; Figura 2.5.3.2), y en menor medida con los resultados obtenidos en el primer experimento de ese estudio (Figura 2.5.3.1). En el primero de aquellos experimentos se obtuvo una mayor uniformidad en la imbibición de las 10 semillas, no registrándose un incremento de la imbibición a partir de las 48 h, mientras que en el segundo experimento se observó una mayor variabilidad, de manera que mientras en unas semillas la imbibición se estabilizaba a las 48 h, en otras no se estabilizaba hasta haber transcurrido 96 h (o incluso hasta 192 h), con lo que el valor medio seguía incrementándose hasta este periodo, coincidiendo el valor medio con lo obtenido en el presente estudio. En la fotografía 2.5.4.1 se presenta cómo las semillas flotan en agua al inicio del ensayo y van cayendo al fondo del vaso de precipitado con el paso del tiempo, señal inequívoca de la imbibición.

En relación a la imbibición determinada en otras especies, el ritmo de imbibición y el valor de la misma son inferiores a los obtenidos por Kulkarni *et al.* (2007) en semillas de la planta medicinal *Dioscorea dregeana* en un estudio de imbibición realizado en placas Petri, con las semillas dispuestas entre dos capas de papel de filtro, humedecido con 4.5 mL de agua destilada. Igualmente fueron inferiores a los determinados por Varela y Albornoz (2013) en semillas de *Anaddenanthera colubrina*, una

especie de la familia *Fabaceae*, cuyas semillas poseen una cubierta delgada y débil, en un ensayo realizado con grupos de 10 semillas, inmersas en 10 mL de agua del grifo durante 8 h.



Fotografía 2.5.4.1. Evolución de la posición de las semillas en remojo con el paso del tiempo. a: al inicio del ensayo; b: a las 8 h; c: a las 20 h.

La imbibición de las semillas comerciales resultó superior a la de las semillas propias (Figura 2.5.4.1) y al realizar el análisis estadístico se constata que en los períodos de remojo en los que se ha realizado el mismo, 96 y 192 h (4 y 8 d), estas diferencias resultaron significativas ($P \leq 0.01$; Tabla 2.5.4.1).

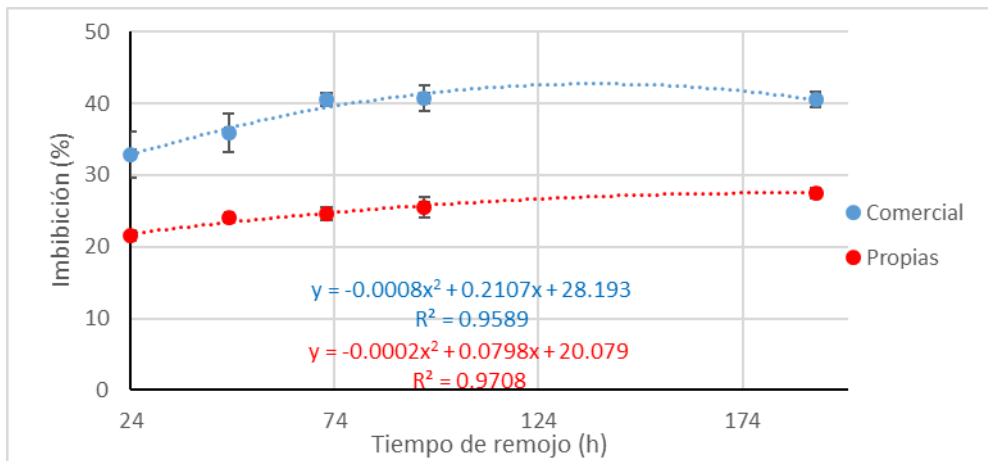


Figura 2.5.4.1. Evolución de la imbibición de agua (%) por parte de las semillas, propias y del lote comercial, en remojo. Valores medios de 4 repeticiones. Las barras verticales representan el error estándar.

Tabla 2.5.4.1. Efecto del lote de las semillas en la imbibición (%) y humedad (%) de las mismas, tras su remojo durante 96 o 192 horas.

	96 h		192 h	
	Imbibición	Humedad	Imbibición	Humedad
Lote				
Propio	25.56 b	27.91 b	27.55 b	28.60 b
Comercial	40.75 a	34.86 a	40.53 a	37.17 a
Análisis de la Varianza				
Factores (grados libertad)	% Suma de cuadrados			
Lote (1)	88.10 **	91.27 **	95.60 **	94.58 **
Residual (6)	11.90	8.73	4.40	5.42
Desviación estándar (+)	3.22	1.24	1.61	1.18

Letras diferentes en una columna indican diferencias significativas con ($P \leq 0.05$) según el test LSD. **: Nivel de significación $P \leq 0.01$. (+) La desviación estándar se ha calculado como la raíz cuadrada del cuadrado medio residual.

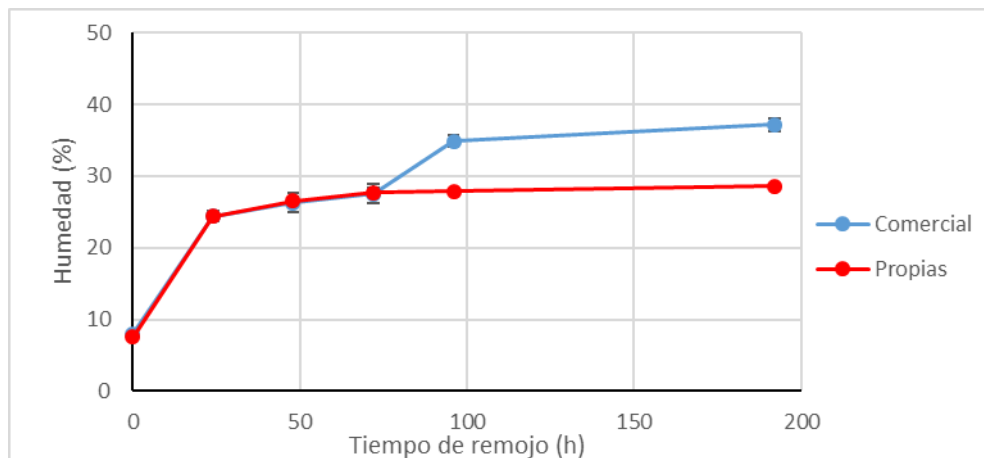


Figura 2.5.4.2. Evolución de la humedad (%) de las semillas, propias y del lote comercial, en remojo. Valores medios de 4 repeticiones. Las barras verticales representan el error estándar.

En la figura 2.5.4.2 se observa que hasta las 72 h (3 d) de remojo no existió ninguna diferencia en la humedad (%) entre las semillas propias y las del lote comercial. A partir de 96 h de inmersión, se detectó un nivel de humedad de las semillas comerciales significativamente mayor ($P \leq 0.01$; Tabla 2.5.4.1) que el de las semillas propias. Las cubiertas de las semillas comerciales presentaban una tonalidad más blanquecina de lo habitual en la especie, y algunas semillas aparecían con la cubierta agrietada, e incluso algunas sin cubierta. Según la experiencia propia, estos rasgos se podrían achacar (i) a una recolección demasiado tardía en relación a la dehiscencia de los frutos, o (ii) a una posible escarificación de las semillas comerciales, bien conseguida involuntariamente en los procesos de extracción del fruto, lavado, secado, o al haber sido sometidas voluntariamente a una escarificación, lo que concuerda con los resultados obtenidos del estudio de las semillas escarificadas, tal y como se verá en el apartado siguiente (apartado 2.5.5).

Las gráficas de la imbibición y de la humedad, aunque parecidas, son diferentes, lo que resulta lógico, dado que son conceptos distintos, ya que la

imbibición se determina a partir del incremento de peso fresco (ec. 2.5.2), mientras que la humedad de las semillas se determina a partir del peso seco, obtenido tras el secado en estufa (ec. 2.5.1). Además, hay que tener presente que la determinación de la humedad es un método destructivo, y por tanto cada determinación se realiza con semillas distintas.

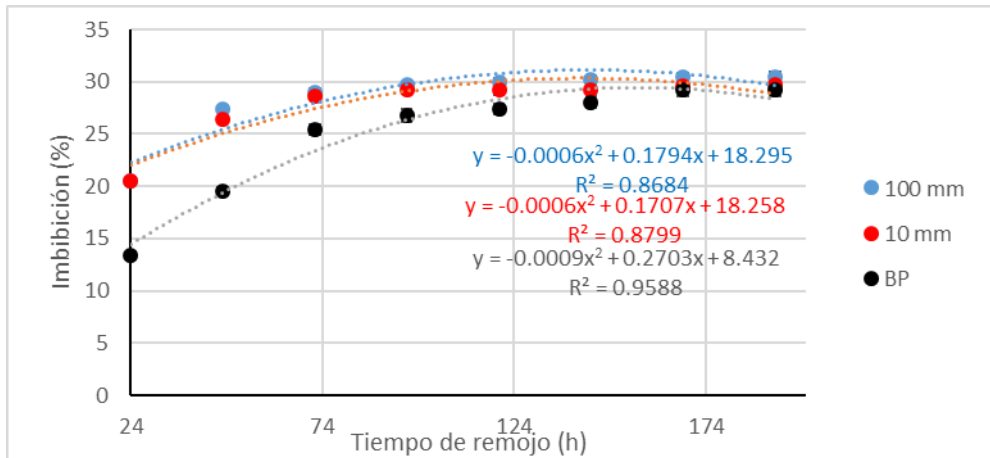


Figura 2.5.4.3. Evolución de la imbibición de agua (%) por parte de las semillas, obtenida con semillas a remojo en columnas de agua de 100 y 10 mm, y humedecidas con el método BP. Valores medios de 4 repeticiones. Las barras verticales representan el error estándar.

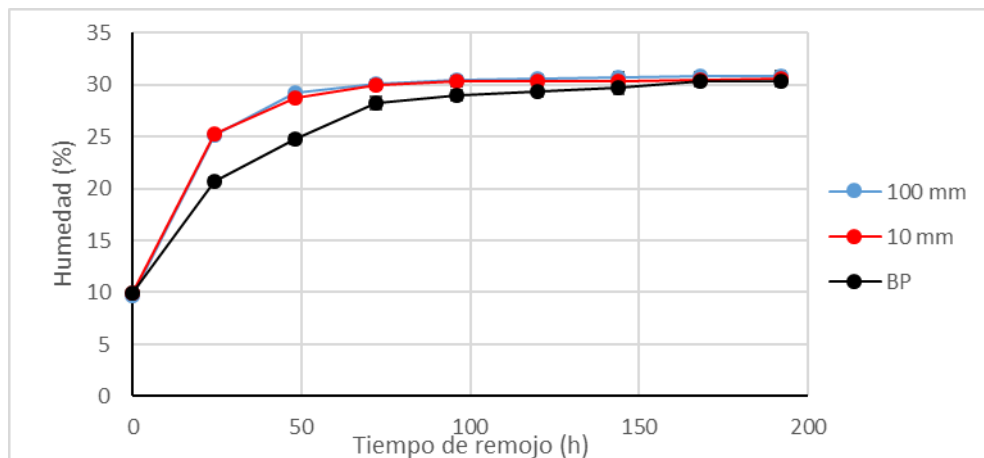


Figura 2.5.4.4. Evolución de la humedad (%) de las semillas, obtenida con semillas a remojo en columnas de agua de 100 y 10 mm, y humedecidas con el método BP.. Valores medios de 4 repeticiones. Las barras verticales representan el error estándar.

En la figura 2.5.4.3 se presenta la evolución de la imbibición acumulada obtenida en el segundo experimento. Durante los dos primeros días el valor de la imbibición obtenida con el papel de filtro humedecido en las placas Petri ha resultado ligeramente inferior al obtenido en las semillas en remojo en las columnas de agua de 10 y de 100 mm (Figura 2.5.4.3) pero pronto se igualan, de manera que a partir del sexto día ya no se aprecian diferencias. Lo mismo cabe decir de la evolución de la humedad de las semillas (Figura 2.5.4.4). Al realizar el análisis estadístico de los valores de la imbibición y de la humedad, en periodos idénticos a los considerados en el primer experimento (Tabla 2.5.4.2), se constata que han resultado significativas a las 96 h de remojo ($P \leq 0.01$), pero no a las 196 h (no existiendo) tampoco diferencias significativas a las 144 h (datos no mostrados).

Tabla 2.5.4.2. Efecto del método de humedecimiento de las semillas en la imbibición (%) y humedad (%) de las mismas, tras su remojo durante 96 o 192 horas.

	96 h		192 h	
	Imbibición	Humedad	Imbibición	Humedad
Método				
Columna 100 mm	29.67 a	30.39	30.52	30.83
Columna 10 mm	29.26 a	30.31	29.72	30.56
Método BP	26.77 b	28.98	29.18	30.31
Análisis de la Varianza				
Factores (grados libertad)	% Suma de cuadrados			
Método (2)	64.19 **	40.41 NS	16.66 NS	5.15 NS
Residual (9)	35.81	59.59	83.34	94.85
Desviación estándar (+)	1.10	0.90	1.42	1.06

Letras diferentes en una columna indican diferencias significativas con ($P \leq 0.05$) según el test LSD. NS: no significativo. **: Nivel de significación $P \leq 0.01$. (+) La desviación estándar se ha calculado como la raíz cuadrada del cuadrado medio residual.

2.5.4.3. Conclusiones

La duración del ensayo de imbibición debe prolongarse durante el mismo periodo que el ensayo de las semillas individuales.

La imbibición de las semillas del lote comercial, de baja viabilidad y nula germinación, presenta un mayor valor que el correspondiente al de las semillas propias. La evolución de la humedad de las semillas comerciales sigue un patrón idéntico al observado en las semillas escarificadas (según se presenta en 2.5.5).

Aunque la imbibición registrada en las semillas de *C. spinosa* L. subsp. *rupestris* es inferior a la citada en la bibliografía en semillas de otras especies que no presentan problemas en la absorción de agua en la

germinación, las cubiertas de las semillas, consideradas en sentido amplio (especialmente el hilo), no son impermeables al agua, permitiendo la absorción de la misma, al ser puestas a remojo o germinar en un sustrato húmedo.

2.5.5. Análisis de la absorción de agua de semillas escarificadas

2.5.5.1. Material y métodos

El ensayo se realizó paralelamente al primero de los experimentos descritos en 2.5.4.1 con la misma metodología, utilizando además de semillas intactas (control), semillas escarificadas con dos tipos de escarificación mecánica: (i) manual, ejerciendo una ligera presión con un dedo sobre las semillas depositadas sobre una superficie dura, hasta agrietar la cubierta; (ii) con bisturí, realizando una pequeña incisión en la cubierta de la semilla, en la parte opuesta a la zona micropilar.

2.5.5.2. Resultados y discusión

En la figura 2.5.5.1 se presentan las curvas ajustadas al modelo cuadrático y las ecuaciones correspondientes, obtenidas a partir de los valores medios de la imbibición de semillas escarificadas, manualmente y con bisturí, y de las semillas intactas. En los tres casos el coeficiente de determinación (R^2) supera el valor de 0.97, resultando estadísticamente significativo ($P \leq 0.05$).

La imbibición de las semillas intactas resultó mayor que la de las escarificadas, y a su vez, en las escarificadas con bisturí fue mayor que en las escarificadas manualmente (Figura 2.5.5.1). Estas diferencias resultaron significativas ($P \leq 0.01$) en las determinaciones realizadas a las 96 y 192 h

(tabla 2.5.5). Estos resultados (que no parecen lógicos, son los obtenidos en un segundo experimento realizado para corroborar los inicialmente obtenidos) indicarían que los tipos de escarificación ensayados, no mejoran la imbibición inicial por parte de las semillas, y en consecuencia no podría afirmarse que la cubierta (en sentido amplio) de las semillas de alcaparra sea impermeable al agua, es decir que aunque la cubierta de la semilla sea dura al tacto, la semilla es capaz de absorber agua cuando está en remojo, y por tanto probablemente también durante los ensayos de germinación, es decir que la semilla de *C. spinosa* subsp. *rupestris*, en sentido estricto, no presenta una latencia física, en contra de lo indicado en la bibliografía (Orphanos, 1983; Macchia y Casano, 1993; Sozzi y Chiesa, 1995; Yildirim, 1998; Tansi, 1999; Rinaldelli, 2000; Pascual *et al.*, 2004).

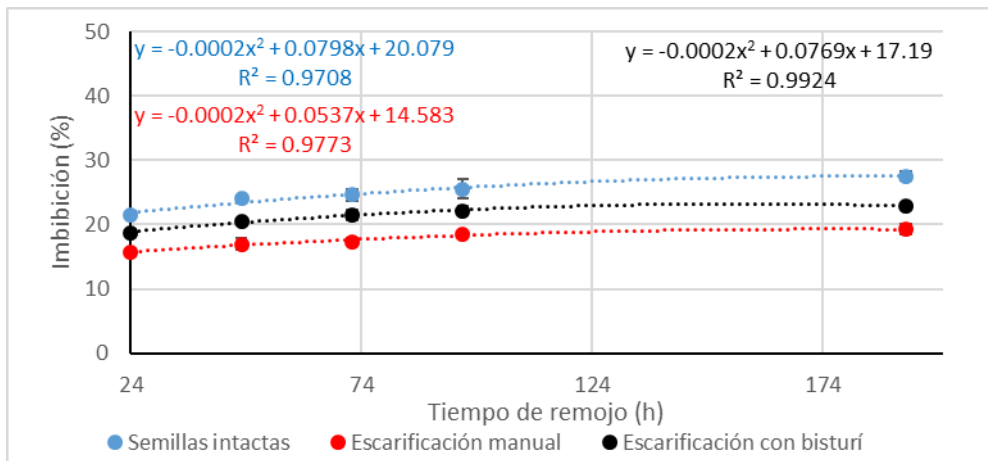


Figura 2.5.5.1. Evolución de la imbibición de agua por parte de las semillas (%), intactas y escarificadas, manualmente o con bisturí, en remojo. Valores medios de 4 repeticiones. Las barras verticales representan el error estándar.

Tabla 2.5.5.1. Efecto del tipo de escarificación realizada a las semillas en la imbibición (%) y en la humedad (%) de las mismas, tras su remojo durante 96 o 192 horas.

	96 h		192 h	
	Imbibición	Humedad	Imbibición	Humedad
Tipo de escarificación				
Semillas intactas	25.56 a	27.91 c	27.55 a	28.60 c
Escarificación manual	18.54 c	33.93 b	19.26 c	34.59 b
Escarificación con bisturí	22.17 b	38.13 a	22.94 b	38.83 a
Análisis de la Varianza				
Factores (grados de libertad)	% Suma de cuadrados			
Tipo de escarificación (2)	75.37 **	96.58 **	90.97 **	96.30 **
Residual (9)	24.63	3.42	9.03	3.70
Desviación estándar (+)	1.89	0.91	1.23	0.95

Letras diferentes en una columna indican diferencias significativas con ($P \leq 0,05$) según el test LSD. **: Nivel de significación $P \leq 0.01$. (+) La desviación estándar se ha calculado como la raíz cuadrada del cuadrado medio residual.

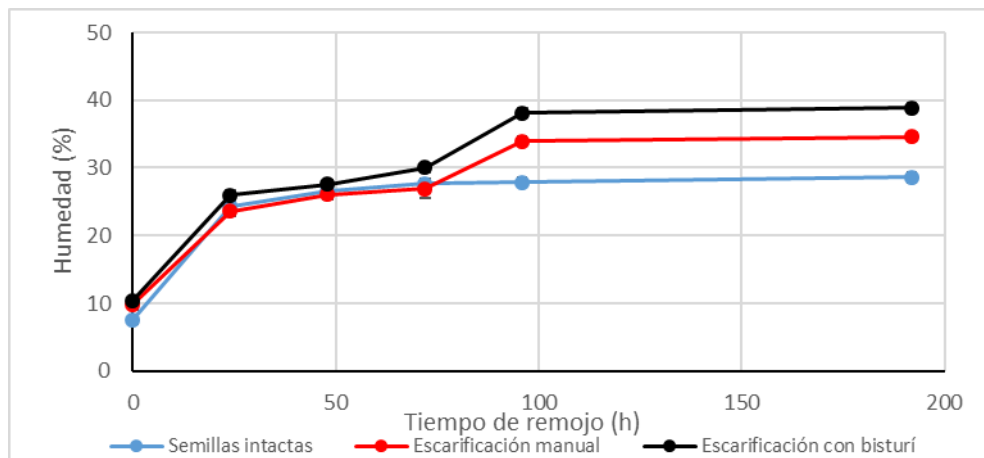


Figura 2.5.5.2. Evolución de la humedad (%) de las semillas en remojo, según el tipo de escarificación (intactas, escarificación manual o con bisturí) realizado a las semillas. Valores medios de 4 repeticiones. Las barras verticales representan el error estándar.

Del análisis de la figura 2.5.5.2 se desprende que inicialmente todas las semillas, intactas y escarificadas, presentaron un notable incremento de la humedad, alcanzando un valor similar en los tres tipos de semillas analizadas durante las primeras 24 h de remojo, observándose un segundo incremento importante de la humedad, únicamente en las semillas escarificadas, en el cuarto día (de las 72 a las 96 h) de remojo. El resultado del segundo incremento de humedad, que no se dio en las semillas intactas, fue que la humedad de las semillas intactas resultó inferior ($P \leq 0.01$) a la de las semillas escarificadas, y entre las escarificadas, también existieron diferencias ($P \leq 0.01$), correspondiendo el mayor valor a las escarificadas con bisturí, probablemente debido a que la herida producida con el bisturí fuera mayor que la producida manualmente, y facilitara en mayor medida la absorción de agua. Estas diferencias se mantuvieron hasta el final del ensayo.

En la evolución de la humedad de las semillas escarificadas (Figura 2.5.5.2) pueden distinguirse cuatro fases: (i) un incremento lineal de la humedad durante el primer día; (ii) un incremento lineal, pero menos intenso, durante los dos días siguientes; (iii) un incremento importante en las semillas escarificadas, durante el día siguiente; (iv) una estabilización (prácticamente) del valor de la humedad durante los cuatro días siguientes. La tercera fase, producida únicamente en las semillas escarificadas, parece coincidir con la tercera fase del modelo trifásico de absorción de agua en la germinación de las semillas (Bewley y Black, 1994; Hartmann *et al.*, 2014; Figura 2.1) concurrente con la emergencia de la radícula, al romperse la cubierta de la semilla.

Al igual que en el apartado 2.5.4 se ha indicado que el ritmo de imbibición y el valor de la misma son inferiores a los obtenidos en otras especies, tampoco parecen elevados los valores de la humedad de las semillas obtenidos con el remojo, oscilando entre el 28.6 % obtenido en las semillas intactas y el 38.8 % de las semillas escarificadas con bisturí. En este estudio se ha constatado que el valor de la humedad de las semillas inmediatamente antes de la emergencia de la radícula está en torno al 30%.

Los resultados presentados en la tabla 2.5.5.1 muestran tendencias opuestas en los niveles de imbibición y de humedad, lo que puede parecer contradictorio, pero hay que tener en consideración los parámetros utilizados en la determinación de los mismos: en la determinación de la imbibición el denominador corresponde al peso fresco inicial (al inicio del periodo de remojo considerado), mientras que, en la determinación de la humedad, el denominador corresponde al peso fresco de las semillas tras el remojo.

2.5.5.3. Conclusiones

Las cubiertas de las semillas, consideradas en sentido amplio (incluyendo el hilo), no son impermeables al agua, permitiendo la absorción de la misma, al ser puestas a remojo.

La escarificación de las semillas de *C. spinosa* L. subsp. *rupestris* incrementa la humedad de las mismas (respecto a las semillas intactas) al ser sometidas a remojo durante un periodo no inferior a 96 h, no observándose este incremento de absorción de agua durante las primeras 48 h del remojo.

Las semillas escarificadas con bisturí presentan mayor humedad que las escarificadas manualmente.

El incremento de humedad obtenido a partir del tercer día de remojo en las semillas escarificadas, coincide con la tercera fase del modelo trifásico de absorción de agua en la germinación de las semillas, concurrente con la emergencia de la radícula, al romperse la cubierta de la semilla.

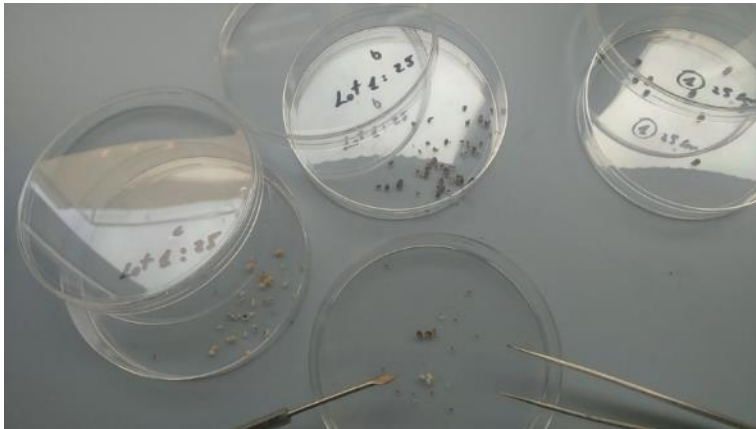
2.5.6. Análisis de la absorción de agua en la cubierta y en el endospermo de las semillas

2.5.6.1. Introducción

El objetivo de este estudio es analizar si la absorción de agua que se produce en la semilla durante el remojo, se produce únicamente en la cubierta de la semilla, o si en cambio también penetra en el interior de la misma, es decir que afecta al endospermo y al embrión

2.5.6.2. Material y métodos

En julio de 2016, cinco grupos de 100 semillas (4 repeticiones de 25 semillas) del lote procedente de frutos recolectados en la cuarta semana de septiembre de 2014, y conservados a temperatura ambiente en botes de vidrio cerrados herméticamente, se mantuvieron durante 0, 1, 2, 3 y 4 d sumergidas en agua. Transcurrido el periodo correspondiente, tras el secado superficial de las semillas, se separó la cubierta del endospermo de las mismas (Fotografías 2.5.6.1 y 2.5.6.2), determinándose la humedad en cada fracción (según 2.5.1).



Fotografía 2.5.6.1. Separación de las semillas en la cubierta y el endospermo.



Fotografía 2.5.6.2. Semilla intacta (a); Cubierta de la semilla (b); endospermo (c).

2.5.6.3. Resultados y discusión

En la figura 2.5.6.1 se presenta la evolución de la humedad correspondiente a las semillas intactas, las cubiertas, y al endospermo. El valor determinado de la humedad de las semillas intactas aumentó del 6.2 al 30.5%, y el del endospermo del 12.5 al 18.9%, es decir que el nivel de humedad del endospermo aumentó un 51%, y por tanto puede concluirse que se produjo una importante imbibición en el mismo.

Durante las primeras 48 h de remojo las semillas intactas alcanzaron un nivel de humedad (28.1 %) mayor que el de la cubierta (14.8 %) y del endospermo (17.3 %), constatándose una mayor humedad (y un mayor incremento de la humedad) de las semillas enteras que la de cada una de sus partes. Debido a que este resultado podría parecer que se debía a una inadecuada manipulación de las semillas, este ensayo se repitió hasta en tres ocasiones, obteniéndose siempre resultados similares. Todo ello a pesar de que siempre se tuvieron en consideración las precauciones indicadas en las normas ISTA (ISTA, 2007) en el procedimiento para determinar la humedad de las semillas, en el sentido de que el tiempo en que las semillas, o sus partes, estuvieron expuestas a la atmósfera del laboratorio siempre fue inferior a 2 min. Los datos presentados corresponden a la tercera repetición del experimento.

La humedad de la cubierta y del endospermo de las semillas almacenadas, antes del remojo (0 h de remojo), resultó mayor que la humedad de las semillas intactas, lo que podría deberse a que, al separar la cubierta del endospermo, tanto la parte interna de la cubierta como la externa del endospermo, hubieran absorbido humedad ambiental. Tras un período de 24 h de remojo, la humedad determinada de la semilla intacta superó significativamente ($P \leq 0.01$; Tabla 2.5.6.1) a la humedad determinada de sus partes, debido probablemente a la evaporación registrada en la superficie interior de la cubierta y en la superficie del endospermo durante la pesada tras el remojo (siguiendo el proceso inverso a cuando las semillas estaban secas), aunque la pesada se hizo con sumo cuidado y con la mayor

rapidez posible. El valor de la suma del peso fresco de la cubierta y del endospermo de las semillas resultó, siempre, inferior al peso fresco de las correspondientes semillas enteras (antes de la separación en sus partes), lo que podría deberse a una hipotética pérdida de material, que a simple vista no ocurrió, y/o a la evaporación producida en la superficie interior de la cubierta y en la superficie del endospermo. Dado que estas diferencias aumentaron con el período de remojo, y por tanto con la humedad de las semillas (Figura 2.5.6.1 y Tabla 2.5.6.2), y llegaron a alcanzar valores superiores al 22% del peso fresco, todo parece indicar que la pérdida de peso estaba relacionada con la pérdida de humedad producida durante los procesos de separación y pesada.

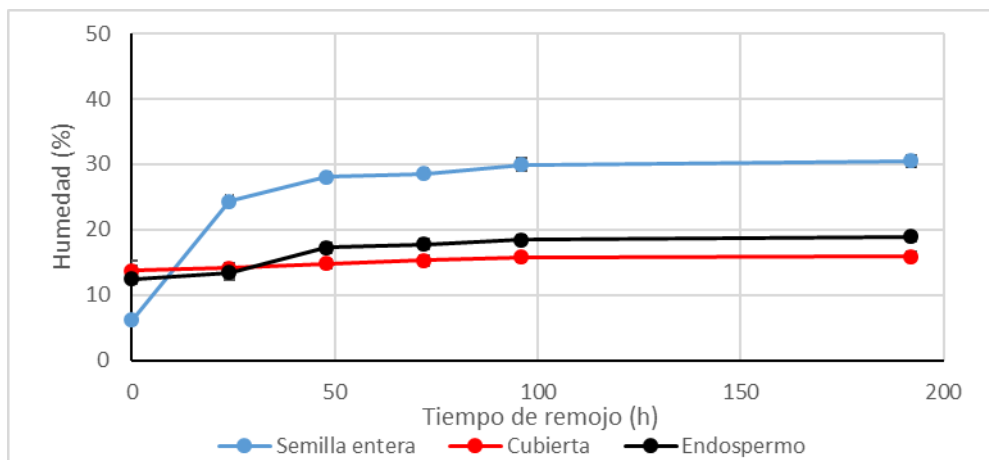


Figura 2.5.6.1. Evolución de la humedad (%) de las semillas intactas, de la cubierta y del endospermo, con el periodo de remojo de las mismas. Valores medios de 4 repeticiones. Las barras verticales representan el error estándar.

En la tabla 2.5.6.1 se analiza el efecto de la duración del período de remojo en la humedad (%) de las semillas, intactas y de sus partes, cubierta y endospermo. Los dos parámetros y su interacción han resultado

estadísticamente significativos ($P \leq 0.01$). Del análisis de la interacción (Figura 2.5.6.2) se constata que la humedad de la semilla intacta aumentó significativamente con el tiempo de remojo (del 6.2 al 30.5%; $P \leq 0.05$); sin embargo, la humedad de la cubierta se mantuvo prácticamente constante (sin diferencias significativas, $P \leq 0.05$) durante el remojo, mientras que la humedad del endospermo se incrementó significativamente con el remojo (del 12.5 al 18.9%; $P \leq 0.05$), representando este incremento el 51% el valor de su humedad inicial, y por tanto puede concluirse que se produjo una importante absorción de agua en el mismo. El incremento importante de la humedad del endospermo se produjo entre las 24 y las 48 h de remojo (Figura 2.5.6.1).

Tabla 2.5.6.1. Efecto del período de remojo (h) en la humedad (%) de las semillas, intactas y de sus partes, cubierta y endospermo.

		Humedad
Partes de la semilla	Semilla intacta	20.37 a
	Cubierta	14.61 b
	Endospermo	14.93 b
Período de remojo	0	10.82 c
	24	17.34 b
	192	21.75 a
Análisis de la Varianza		
Factores (grados de libertad)	% suma de cuadrados	
Partes de la semilla (2)	14.88 **	
Período de remojo (2)	42.97 **	
Partes de las semillas x Período de remojo (4)	38.66 **	
Residual (27)	3.48	
Desviación estándar (+)	1.48	

Letras diferentes en una columna indican diferencias significativas con ($P \leq 0,05$) según el test LSD **: Nivel de significación $P \leq 0.01$. (+) La desviación estándar se ha calculado como la raíz cuadrada del cuadrado medio residual.

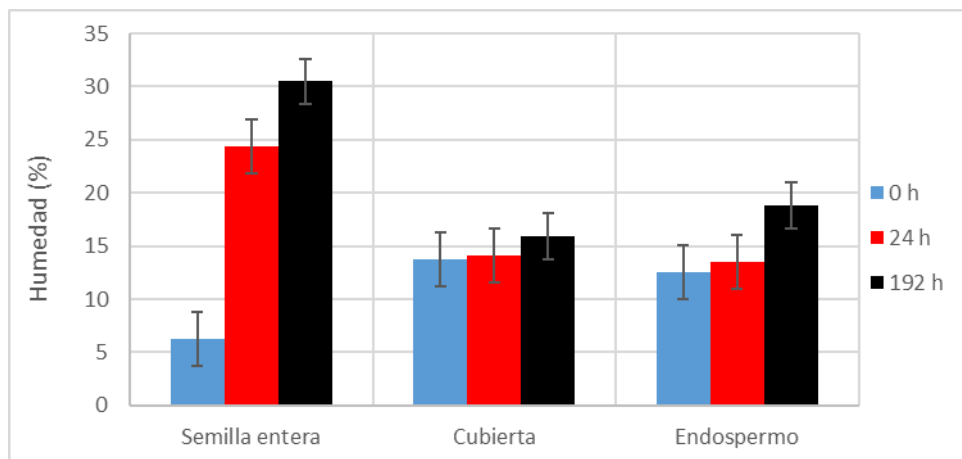


Figura 2.5.6.2. Análisis de la interacción “Partes de la semilla x Período de remojo” de la tabla 3.3. Las barras indican el intervalo LSD.

Tabla 2.5.6.2. Evolución de la humedad (%) de la semilla y de la pérdida de peso fresco de la misma al separar la cubierta del endospermo, para distintos períodos de remojo. Valor medio de las 4 repeticiones.

Período de remojo (h)	Humedad (%)	Pérdida de peso fresco (%)
0	6.22	16.50
24	24.38	16.90
48	28.06	17.53
72	28.60	18.50
96	29.96	22.19
192	30.50	22.82

2.5.6.3. Conclusiones

La cubierta de la semilla (considerada en sentido amplio, incluyendo al hilo) de *C. spinosa* subsp. *rupestris*, permite el paso del agua hasta el endospermo, observándose un incremento de humedad del mismo a las 48 h de estar a remojo, por lo que no puede afirmarse que la cubierta de estas semillas sea impermeable, al menos totalmente, y por tanto tampoco que presenten latencia física.

2.6. INFLUENCIA DE LA EDAD DE LAS SEMILLAS DE *CAPPARIS SPINOSA* L. SUBSP. *RUPESTRIS* EN SU GERMINACIÓN

2.6.1. Introducción

Con el envejecimiento de las semillas se produce su deterioro, con lo que disminuye su vigor y su capacidad de germinación (Walters, 2002). El grupo de investigación en el que se enmarca esta tesis doctoral ha estudiado la evolución del poder germinativo de las semillas de alcaparra durante un período de almacenamiento de 4 años, ajustando las curvas a funciones cuadráticas (Pascual *et al.*, 2006), determinando con estos condicionantes la longevidad de las mismas. Por otra parte, en experimentos no publicados, han obtenido diferentes valores del porcentaje de germinación con semillas de un mismo lote, en ensayos de germinación realizados en diferentes fechas dentro de la misma campaña.

El objetivo de este apartado de la tesis doctoral es analizar la longevidad de las semillas, así como la influencia de la edad misma en la germinación, incluyendo la influencia del tiempo transcurrido entre la recolección de las semillas y el inicio del ensayo de germinación, durante los tres primeros meses tras la recolección. Para conseguir estos objetivos se han planteado los dos estudios que se presentan a continuación.

2.6.2. Análisis de la longevidad de las semillas de *C. spinosa* L. subsp. *rupestris*. e influencia de la edad de la semilla en la germinación

2.6.2.1. Introducción

El deterioro de las semillas es el proceso por el cual las semillas pierden vigor, y con el tiempo, finalmente mueren; generalmente el deterioro se define como un cambio desfavorable que se produce con el tiempo, es decir con el envejecimiento, aunque también puede considerarse como cambios que se producen con bajos contenidos de humedad (daño por desecación) o por altas o bajas temperaturas (daños por desnaturalización o por congelación, respectivamente) (Walters, 2006 a). Las reacciones del deterioro se producen durante el almacenamiento de las semillas, pero sus efectos se detectan cuando las semillas son puestas a germinar. El deterioro es causado por el efecto combinado de lesiones, producidas como consecuencia del proceso de secado o con el tiempo transcurrido después de la maduración, y la progresiva inhabilidad para reparar estas lesiones (Walters, 2006 a).

La longevidad de una semilla es el periodo transcurrido desde la maduración de la misma hasta que la semilla muere (Ellis y Roberts, 1981); no obstante, no es posible determinar la longevidad de una semilla individual porque el test de viabilidad es destructivo. En la práctica, cualquier medida de longevidad ha de aplicarse a una población.

La viabilidad o periodo de viabilidad puede describirse como el periodo transcurrido hasta que una determinada proporción de semillas de una población, como un lote de semillas, muere (Ellis y Roberts, 1981). Pero también se entiende por viabilidad, la posibilidad de que germine una población de semillas, o lo que es lo mismo, el potencial de germinación que tiene población de semillas (Probert y Linington, 2006). Es decir que semilla viable es la que tiene suficiente tejido vivo para ser capaz de germinar (en ausencia de latencia) si las condiciones ambientales (humedad,

temperatura e iluminación) son adecuadas. Por el contrario, una semilla no viable es incapaz de germinar en tales circunstancias, pero no necesariamente está muerta (Probert y Linington, 2006), aunque inicialmente se considerara que una semilla perdiera la viabilidad cuando moría (Roberts, 1972; Ellis y Roberts, 1981).

La viabilidad de una población de semillas se expresa habitualmente, y de forma correcta, tanto utilizando el porcentaje de unidades que germinan en los test de germinación (asumiendo la ausencia de latencia en las semillas de la fracción no germinadas), como utilizando el porcentaje de semillas que se muestran viables en los test alternativos de viabilidad, como el test del tetrazolio (Probert y Linington, 2006). Una medida del periodo de viabilidad utilizada convencionalmente, es el periodo de viabilidad media, o periodo transcurrido hasta que la viabilidad desciende al 50% (*half-viability period*). Por tanto, se considera que el periodo de viabilidad es el tiempo transcurrido hasta que la viabilidad o el porcentaje de germinación de las semillas disminuya al 50% (Ellis *et al.*, 1990), y se conoce también como longevidad de las semillas.

Pascual *et al.* (2006) obtuvieron la longevidad de las semillas de alcaparra en condiciones de laboratorio, determinada como el tiempo transcurrido hasta que el porcentaje de germinación de las semillas descendía hasta el 50%. Para superar la latencia humedecían el sustrato (papel de filtro) con una solución de AG₃ a 500 mg L⁻¹, realizando o no, previamente, un tratamiento de escarificación química con ácido sulfúrico concentrado durante 60 min (1h). Obtuvieron que la escarificación química resultaba positiva para las semillas recién recolectadas y para las almacenadas hasta tres años, pero resultaba contraproducente para las semillas almacenadas durante cuatro años.

Las normas ISTA (ISTA, 2007) indican que cuando las semillas presentan latencia, el ensayo de germinación debe realizarse aplicando el método que mejor resultado dé para superar la latencia. Al iniciar este estudio se ensayó, con semillas recién cosechadas, el aporte de AG₃ y la escarificación química, con tratamientos conjuntos, aislados y los

respectivos controles, obteniendo los mejores resultados con el tratamiento único de aporte de AG₃ al sustrato. Dado que con estas semillas recién recolectadas el aporte de AG₃ obtuvo el mejor resultado, y de que en estudios realizados anteriormente (Pascual *et al.*, 2006 a) también obtuvo el mejor resultado en las semillas más longevas (almacenadas durante cuatro años), se decidió realizar el aporte de AG₃ al sustrato como tratamiento único para superar la latencia.

2.6.2.2. Material y métodos

Las semillas utilizadas en el presente estudio fueron recolectadas diariamente durante la tercera semana de septiembre de 2008 y de 2009, siguiendo los procedimientos de selección, extracción, limpieza, secado y almacenado, indicados en 2.2.1.

Durante la primera quincena del mes de octubre de cada año, a partir de 2008, se tomó una muestra de 240 semillas del lote de semillas recolectadas en la tercera semana del mes de septiembre de 2008 (200 semillas para el ensayo de germinación y 40 para el ensayo de viabilidad), y, además, a partir de 2009, otra muestra de 240 semillas del lote de semillas recolectadas en la tercera semana del mes de septiembre de 2009 (200 semillas para el ensayo de germinación y 40 para el ensayo de viabilidad).

La viabilidad de las semillas se determinó mediante la realización del test de viabilidad, siguiendo el procedimiento indicado en 2.2.2. Los ensayos de germinación se realizaron siguiendo el procedimiento indicado en 2.2.3.

2.6.2.3. Resultados y discusión

En la figura 2.6.2.1 se presenta la evolución de la viabilidad y de la germinación de las semillas en función del período de conservación. Se observa que las dos curvas son muy similares, y que la pérdida de germinación precede a la pérdida de viabilidad, siendo también semejantes a las curvas de vigor y viabilidad típicas (Justice y Bass; 1979; Figura 2.1.3). Las curvas tienen forma sigmoidea, lo que concuerda con Roberts (1972), quien afirmó que, sin ninguna duda, en condiciones ambientales constantes, la curva de supervivencia es sigmoidea.

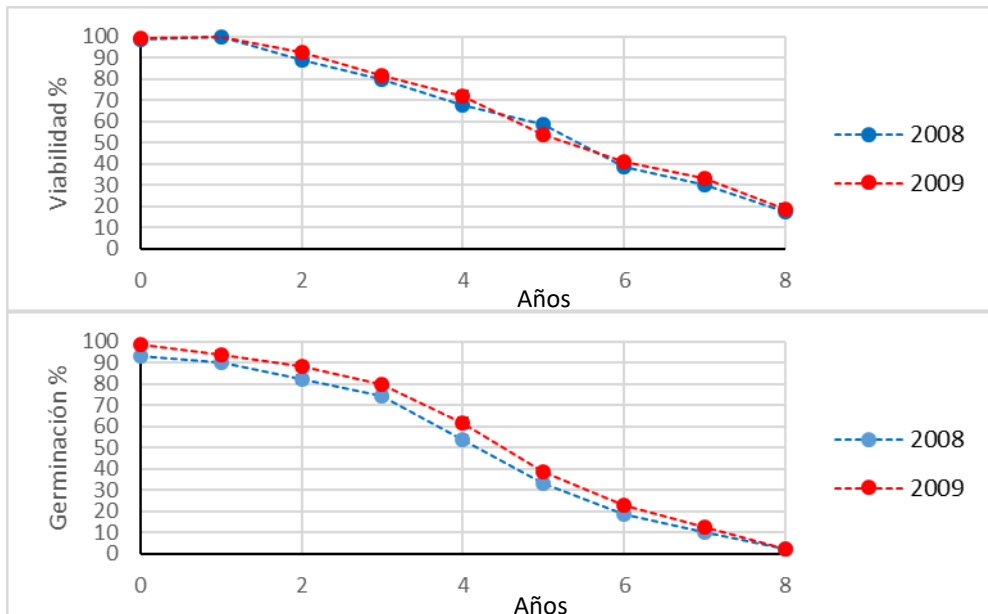


Figura 2.6.2.1. Evolución de la viabilidad y de la germinación de las semillas de los dos lotes analizados (2008 y 2009), obtenidas en los respectivos test al tetrazolio y de germinación.

Tal y como describen Justice y Bass (1979), en la curva de supervivencia (en este caso las curvas de germinación y de viabilidad) de las semillas secas en condiciones ambientales favorables pueden distinguirse tres partes. La primera representa el periodo en que la semilla es vigorosa y la disminución de las funciones vitales de las semillas ha avanzado lentamente. Esta etapa termina con un nivel de supervivencia (germinación) próximo al 85%, y entonces el deterioro aumenta más rápido. Después de que el deterioro ha avanzado hasta alcanzar un nivel de supervivencia (germinación y viabilidad) del orden del 20%, se ralentiza de nuevo y continúa disminuyendo más lentamente hasta que prácticamente se anula.

Aunque las curvas de germinación y viabilidad (V y G) tienen forma sigmoidea, al ser negativas ha resultado imposible realizar adecuadamente los ajustes respectivos, por lo que se han obtenido las transformadas $100 - V$ y $100 - G$, que representan la pérdida de viabilidad y de poder germinativo, respectivamente, y que al resultar positivas ha sido posible realizar los ajustes correspondientes. En la figura 2.6.2.2 se presentan las funciones “Pérdida de viabilidad” ($PV = 100 - V$) y “Pérdida de poder germinativo” ($PG = 100 - G$), para los valores medios de los dos experimentos.

Dado de que todas las curvas de supervivencia se ajustan a la distribución normal acumulada negativa, de acuerdo con Ellis y Roberts (1980), es adecuado utilizar el análisis *probit* (Finney, 1962) para determinar el periodo de viabilidad media (p_{50}) y la desviación estándar de la distribución de la pérdida de viabilidad de las semillas en el tiempo (σ).

Roberts (1960) desarrolló tres ecuaciones básicas de viabilidad, pero posteriormente Ellis y Roberts (1981) observaron que estas ecuaciones presentaban limitaciones, obteniendo una nueva ecuación de viabilidad, que incluye cinco constantes, de las cuales cuatro (K_E , C_W , C_H , y C_Q) son aplicables para los diferentes lotes de semilla de una especie, y uno (K_i) es específico para cada lote de semillas.

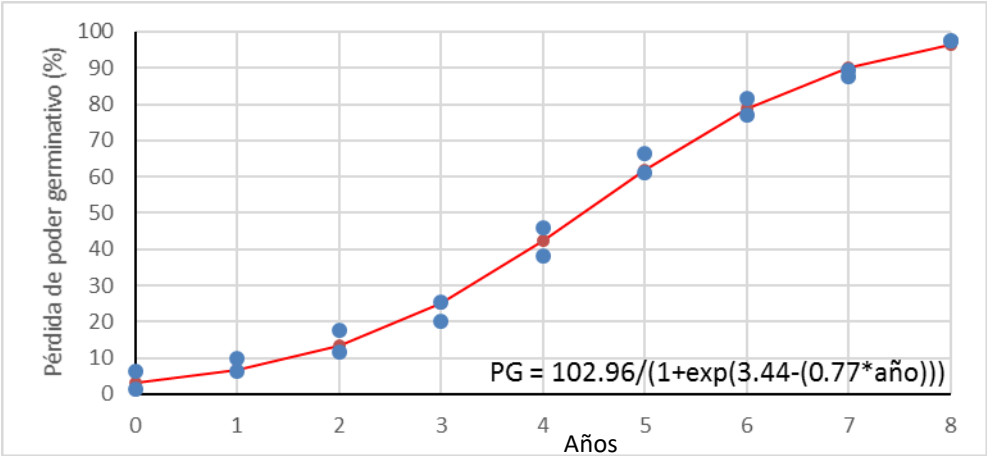
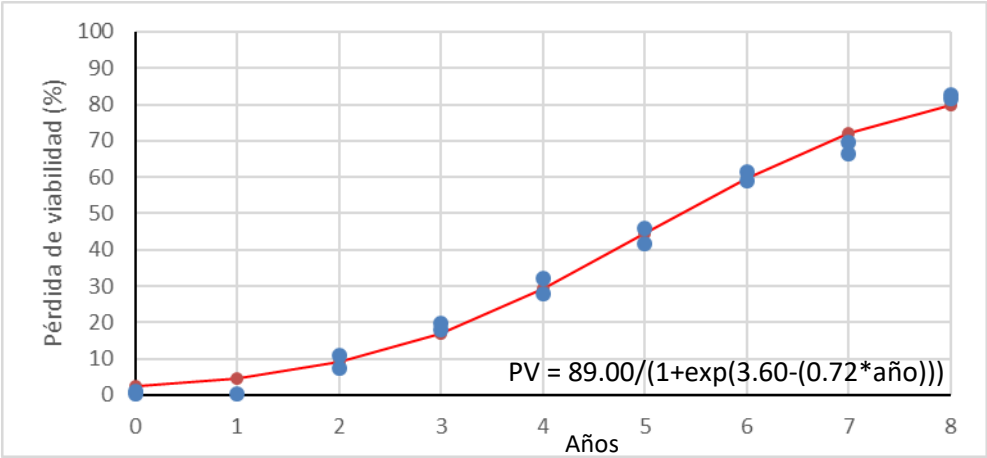


Figura 2.6.2.2. Funciones “Pérdida de viabilidad” (PV = 100 - V) y “Pérdida de poder germinativo” (PG = 100 - G) correspondientes a los valores medios de los dos experimentos.

La obtención de todas las constantes resulta de cierta complejidad, no obstante, el valor de p50 puede calcularse con precisión, gráficamente, cuando los datos de porcentaje de germinación y/o de viabilidad son transformados a valores *probit*, ya que las curvas de supervivencia se

convierten en líneas rectas (Fig. 2.6.2.3); el valor de p50 puede obtenerse señalando en la escala del tiempo el punto en que la curva de supervivencia (germinación en este caso) intercepta al nivel del 50% de la supervivencia (germinación) (Bewley y Black, 1994). La desviación estándar (σ), que es la inversa de la pendiente de la curva de supervivencia de la semilla cuando los porcentajes de germinación se transforman en valores *probit* (Finney, 1962), también puede estimarse señalando el punto en que la curva de supervivencia intercepta al nivel del 15.9% (o 84.1%) y midiendo en la escala del tiempo, la distancia de este punto al punto que representa el p50 (Bewley and Black, 1994).

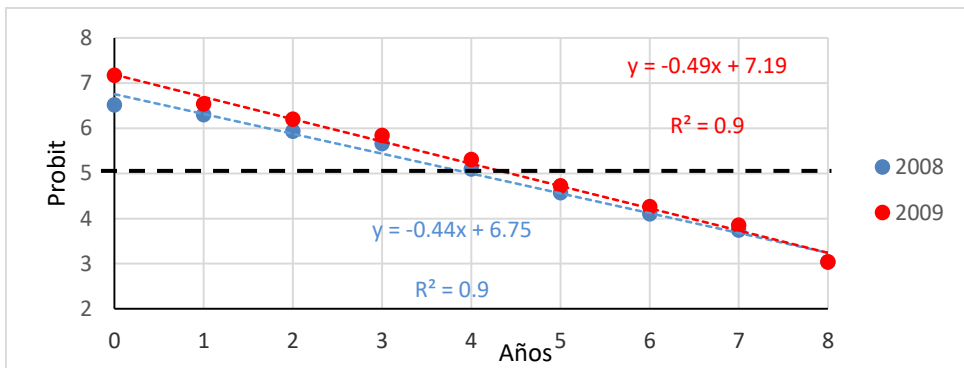


Figura 2.6.2.3. Evolución del porcentaje de germinación de las semillas, con las ordenadas expresadas en escala *probit*.

En este caso el valor de p50 de las semillas, considerando el porcentaje de germinación, es de 4.15 años para el lote del primer experimento y de 4.43 para el lote del segundo experimento. Los valores de la desviación estándar son 2.23 y 2.03 años respectivamente. Estos valores de p50 corresponden a un valor del Índice de Almacenamiento Relativo [*Relative Storability Index* (RSI; Copeland y McDonald, 1995)] igual a 2. Un valor de RSI igual a 1 (2; 3) corresponde a que el 50% de las semillas

del lote germine después de 1 a 2 años (de 3 a 5 años; después de 5 o más años) de almacenamiento. Según este valor de RSI, que se corresponde con el periodo de longevidad media, definido como el periodo transcurrido hasta que la viabilidad/germinación desciende al 50%, es similar, entre otros, al del brócoli, col y coliflor, maíz dulce, pepino, melón y guisante (Justice y Bass, 1979; Copeland y McDonald, 1995).

Los valores obtenidos de p_{50} son similares a los obtenidos por Pascual *et al.* (2006) con semillas de alcaparra producidas en 1999 (3.85 años), resultando estas pequeñas diferencias totalmente lógicas, tal y como se verá posteriormente al analizar los otros parámetros de la germinación. En ese estudio, Pascual *et al.* (2006) analizaron la evolución de la viabilidad y de la germinación de las semillas (escarificadas químicamente y con el aporte de AG_3 al sustrato), durante un almacenamiento de hasta cuatro años a la temperatura de $7^{\circ}C$, ajustando las curvas a sendas funciones cuadráticas ($R^2=0.98$ y $P=0.02$ en ambos casos). En la figura 2.6.2.4 se presenta la evolución de la viabilidad y de la germinación obtenida en este estudio, con los ajustes correspondientes a modelos cuadráticos, similares a los obtenidos con las semillas de 1999, es decir considerando únicamente los cuatro primeros años de almacenamiento.

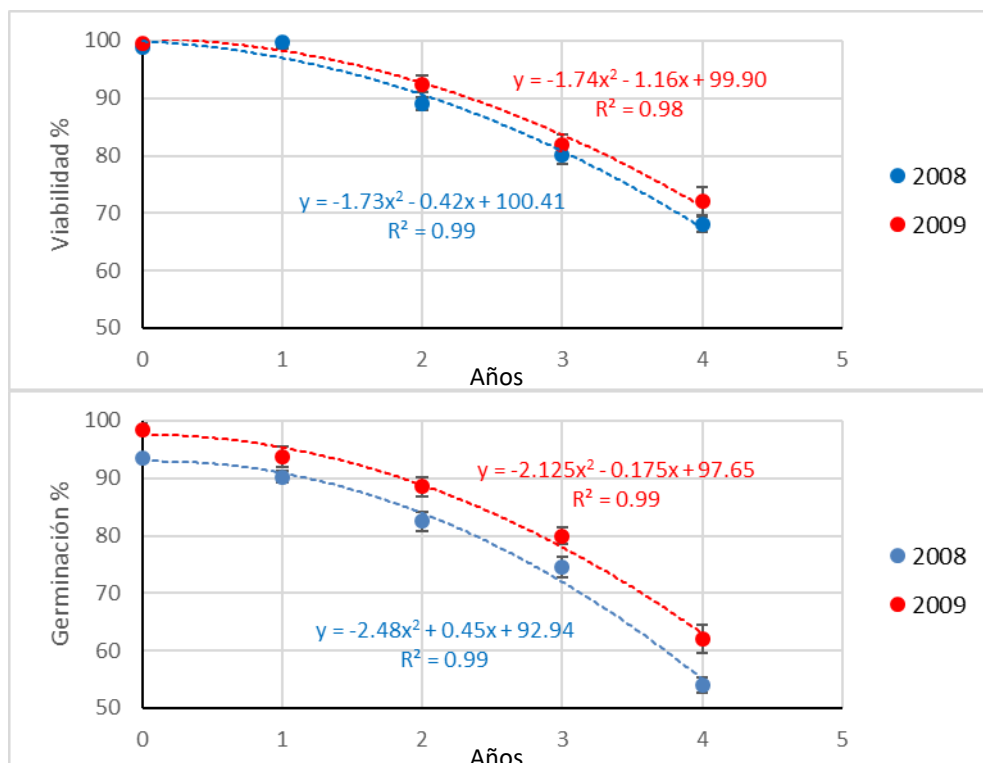


Figura 2.6.2.4. Evolución de la viabilidad y de la germinación de las semillas de los dos lotes analizados (2008 y 2009), obtenidas en los respectivos test al tetrazolio y de germinación, considerando únicamente los cuatro primeros años de almacenamiento.

Todas las curvas de germinación obtenidas en este estudio han presentado unos coeficientes de correlación superiores a 0.85 y el modelo logístico ha resultado significativo ($p \leq 0.01$) (datos no incluidos). Por lo tanto, la función logística es adecuada para analizar la germinación de los dos lotes de semillas de *C. spinosa* subsp. *rupestris* utilizados en este estudio, tal y como lo fue en anteriores estudios realizados sobre la germinación de semillas de alcaparra (Pascual *et al.*, 2006; Pascual *et al.*,

2009). La posibilidad del uso de la función logística permite el uso de las variables A , β y k .

La figura 2.6.2.5 representa el modelo logístico ajustado de los test de germinación realizado en cada lote de semillas y cada año de edad. Se observa que la germinación del lote del 2009 ha sido superior a la obtenida en el lote del 2008 y que la germinación disminuye al aumentar el periodo de almacenamiento.

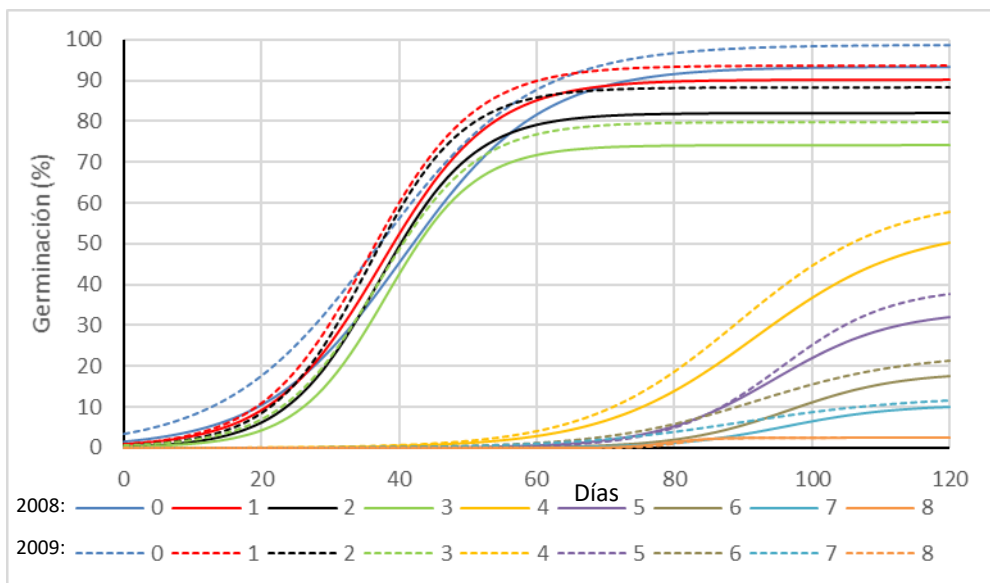


Figura 2.6.2.5. Modelo logístico ajustado de los test de germinación realizados en cada lote de semillas y cada año de edad.

La tabla 2.6.2.1 presenta el análisis estadístico de los valores de G , A , t_{50} y $k/2$ obtenidos en los ensayos de germinación realizados en cada lote y edad de las semillas. En relación a G y A , han existido diferencias significativas ($p \leq 0.01$) en cuanto al efecto del lote de las semillas (año de producción), de manera que las semillas producidas en 2009 han obtenido

un mayor porcentaje de germinación que las producidas en 2008, y también en cuanto al efecto de la duración del almacenamiento, no resultando significativa su interacción ($p \leq 0.01$). A pesar de que esta interacción no ha resultado significativa ($P \leq 0.05$), se ha considerado conveniente presentar sus datos en la tabla 2.6.2.2. Los mayores porcentajes de germinación se han obtenido con las semillas recolectadas en la campaña en la que se ha realizado el ensayo de germinación, y a medida que las semillas presentan mayor edad han obtenido menores porcentajes de germinación ($P \leq 0.01$). Exactamente lo mismo cabe indicarse respecto a la viabilidad.

Tabla 2.6.2.1. Influencia del lote de la semilla (año de producción) y de la edad de las semillas (años de almacenamiento) en la viabilidad (V, %), el porcentaje de germinación acumulada (G, %), germinación final (A, %), t_{50} (d) y $k/2$ (d^{-1}).

	V	G	A	t_{50}	$k/2$
Lote de semillas (L)					
2008	63.94 b	51.08 b	51.09 b	67.89	0.085
2009	65.56 a	55.53 a	55.49 a	65.75	0.084
Edad de las semillas (E, años)					
0	99.13 a	96.00 a	95.85 a	38.73 c	0.048 b
1	95.75 b	92.00 b	92.06 b	36.46 c	0.064 b
2	90.75 c	85.50 c	85.23 c	36.29 c	0.073 b
3	81.13 d	77.25 d	76.96 d	37.46 c	0.074 b
4	70.00 e	58.00 e	57.83 e	90.45 a	0.045 b
5	56.25 f	36.25 f	36.52 f	94.99 a	0.060 b
6	39.75 g	20.75 g	20.79 g	94.28 a	0.054 b
7	32.00 h	11.50 h	11.60 h	92.97 a	0.051 b
8	18.00 i	2.50 i	2.51 i	79.75 b	0.183 a

Análisis de la Varianza

Factores (grados libertad)	% Suma de cuadrados				
L (1)	0.08 *	0.41 **	0.41 **	0.16 NS	0.01 NS
E (8)	98.98 **	99.08 **	99.15 **	97.31 **	53.27 **
L * E (8)	0.18NS	0.10S	0.09NS	0.20NS	1.96NS
Residual (54)	0.76	0.40	0.35	2.33	44.76
Desviación estándar (+)	2.843	2.533	2.363	4.788	0.043

Letras distintas en una misma columna indican diferencias ($p \leq 0,05$) según el test LSD. NS: no significativa. ** (*): nivel de significación $p \leq 0,01$ ($p \leq 0,05$). (+) La desviación estándar se ha calculado como la raíz cuadrada del cuadrado medio residual.

Tabla 2.6.2.2. Efecto de la interacción de la tabla 2.6.2.1: “Lote de semillas (año de producción) x Edad de las semillas (años de almacenamiento)” en la viabilidad (V, %), el porcentaje de germinación acumulada (G, %), germinación final (A, %), t_{50} (d) y $k/2$ (d⁻¹).

Lote	Edad	V	G	A	t_{50}	$k/2$
2008	0	98.75	93.50	93.55	40.56	0.05
	1	94.50	90.25	90.30	37.40	0.06
	2	89.00	82.50	82.17	37.11	0.07
	3	80.25	74.50	74.17	38.08	0.08
	4	68.00	54.00	54.37	91.74	0.05
	5	58.50	33.50	33.58	94.55	0.06
	6	38.50	18.50	18.61	96.68	0.06
	7	30.50	10.50	10.55	96.14	0.06
2009	8	17.50	2.50	2.51	78.80	0.17
	0	99.50	98.50	98.65	36.90	0.05
	1	97.00	93.75	93.83	35.53	0.07
	2	92.50	88.50	88.28	35.47	0.07
	3	82.00	80.00	79.75	36.85	0.07
	4	72.00	62.00	61.30	89.16	0.05
	5	54.00	39.00	39.47	95.44	0.06
	6	41.00	23.00	22.96	91.88	0.05
7	33.50	12.50	12.65	89.80	0.04	
8	18.50	2.50	2.51	80.70	0.20	
LSD		3.367	3.000	2.798	5.671	0.050

Como se ha indicado anteriormente, es habitual encontrar diferencias significativas entre el poder germinativo de diferentes lotes de semillas de alcaparra, tal y como ocurrió en el estudio de longevidad realizado por Pascual *et al.* (2006). No es extraño que algún lote de semillas presente valores de germinación muy bajos, como le ocurrió a Mascarós (2009), que con las semillas producidas en 2006 obtuvo valores de germinación tan bajos que no pudieron ajustarse al modelo logístico. Posteriormente, Fernández (2015) en ensayos realizados en 2015, también obtuvo porcentajes de germinación prácticamente nulos con lotes de semillas producidas en 2011 y 2012, mientras que obtuvo valores aceptables en lotes

de semillas producidos en 2014 y en 2013, con menores valores para las semillas de cinco años de edad (producidas en 2010). También es habitual encontrar semillas comerciales con germinación nula (Navarro, 2016). Respecto a la germinación final (A , %), puede decirse exactamente lo mismo que se ha discutido en el porcentaje de germinación.

El índice t_{50} no se ha visto afectado significativamente (Tabla 2.6.2.1) por el lote, pero sí ($P \leq 0.01$) por la edad de las semillas, aumentando significativamente su valor ($P \leq 0.05$) a partir de los cuatro años de almacenamiento, lo que resulta lógico, puesto que al aumentar la edad de las semillas se incrementa su deterioro, disminuyendo su vigor, por lo que para un mismo poder germinativo resulta lógico que aumente el t_{50} . Mención especial pueden tener las semillas de más edad, puesto que, al tener una germinación tan baja, del orden del 2%, pueden alcanzar su germinación definitiva antes que otras semillas de menor edad, aunque comenzaran a germinar más tarde.

La velocidad relativa de germinación acumulada ($k/2$; Tabla 2.6.2.1) ha presentado diferencias significativas ($p \leq 0.01$), destacando únicamente la elevada velocidad de germinación de las semillas de 8 años, pero se debe a que únicamente germinó el 2.5% de las semillas, por lo que no presenta ningún interés práctico.

2.6.2.4. Conclusiones

La forma de la curva de supervivencia, tanto considerando la viabilidad de las semillas, como la germinación de las mismas es sigmoidea.

El modelo logístico resulta adecuado para analizar la germinación de los lotes de semillas utilizados.

A partir de los valores de viabilidad y germinación se han obtenido las funciones “Pérdida de viabilidad” y “Pérdida de poder germinativo” y se han realizado los ajustes correspondientes.

La germinación de las semillas disminuye al aumentar el periodo de almacenamiento, y a partir del cuarto año aumenta el periodo necesario para que se alcance el 50% de la germinación.

Se ha determinado el periodo de viabilidad media, que está entre 4 y 4.5 años.

2.6.3. Influencia del período transcurrido desde la recolección de las semillas de *C. spinosa* L. subsp. *rupestris* hasta el inicio del ensayo de germinación realizado durante los tres primeros meses tras la recolección

2.6.3.1. Introducción

En estudios realizados por el grupo de investigación en el que se enmarca esta tesis doctoral (Pascual *et al.*, 2003; 2004; 2006; 2009) se ha constatado que la germinación de las semillas de *C. spinosa* es muy irregular, de manera que la germinación de las semillas depende de la posición del fruto en la rama y del peso del fruto del que proceden (Pascual *et al.*, 2003), y de que semillas recolectadas en la misma fecha de años distintos pueden presentar diferente poder germinativo (Pascual *et al.*, 2009). De la observación de los resultados obtenidos al realizar ensayos de germinación el mismo año que se han producido las semillas, utilizando semillas de un mismo lote, se desprende que el porcentaje de germinación de las semillas podría depender del periodo transcurrido entre su recolección y la iniciación del ensayo de germinación.

El objetivo de este estudio es analizar la influencia del período transcurrido desde la recolección de las semillas hasta el inicio del ensayo

de germinación realizado durante los tres primeros meses tras la recolección.

2.6.3.2. Material y métodos

Para que todas las semillas tuvieran el mismo grado de madurez, la recolección de los frutos se realizó diariamente, de manera que todos los frutos se recolectaron tras la dehiscencia (el mismo día o el siguiente). Los frutos fueron recolectados en cuatro períodos distintos de cada año, concretamente las primeras semanas de julio, agosto, septiembre y octubre, de 2013, 2015 y 2016. En la tabla 2.6.3.1 se presentan las fechas de recolección de los frutos correspondientes a los distintos períodos de recolección y el número de días transcurridos desde la recolección hasta el inicio del ensayo de germinación.

Tabla 2.6.3.1. Fechas de recolección y número de días transcurridos desde la recolección hasta el inicio del ensayo de germinación (DDR), para cada período de recolección.

Período de Recolección	DDR
Primera semana de julio	90
Primera semana de agosto	60
Primera semana de septiembre	30
Primera semana de octubre	0

Las semillas fueron extraídas del fruto el mismo día que fueron recolectados, según el procedimiento indicado en 2.2.1, seleccionando las semillas maduras por decantación. El ensayo de germinación se inició la primera semana de octubre de cada año, en placas Petri de 9 cm de diámetro, siguiendo el procedimiento indicado en el apartado 2.2.3 (ISTA, 2007). El sustrato (papel de filtro) se humedeció con una solución de AG₃, a

la concentración de 500 mg L⁻¹ (Giber 3. Salquisa Agrociencias. AG₃ 1,6% p/v). En cada placa se sembraron 50 semillas, con 4 repeticiones para cada período de recolección (ISTA, 2007). El seguimiento de la germinación se mantuvo durante 150 días, humedeciéndose el papel de filtro con la solución de AG₃, realizando el conteo de las semillas germinadas con una frecuencia de tres veces por semana.

2.6.3.3. Resultados y discusión

En todos los casos (48), el ajuste de los datos de germinación al modelo logístico, ha resultado estadísticamente significativo ($P \leq 0,05$), con coeficientes de determinación (R^2) superiores al 95%, lo que confirma que también en este estudio, la utilización de la función logística es adecuada para el análisis de la germinación de las semillas de alcaparra, tal y como se muestra en anteriores estudios (Pascual *et al.*, 2006; 2009) y en los diferentes apartados de esta tesis doctoral.

En la figura 2.6.3.1 se presenta el modelo logístico ajustado a la germinación acumulada, correspondiente a los valores medios de los cuatro períodos (número de días) transcurridos desde la recolección hasta el inicio del ensayo de germinación (DDR). Se observa una clara diferencia entre las curvas correspondientes a los distintos lotes (años) de semillas y entre (la mayoría de) las curvas de cada lote.

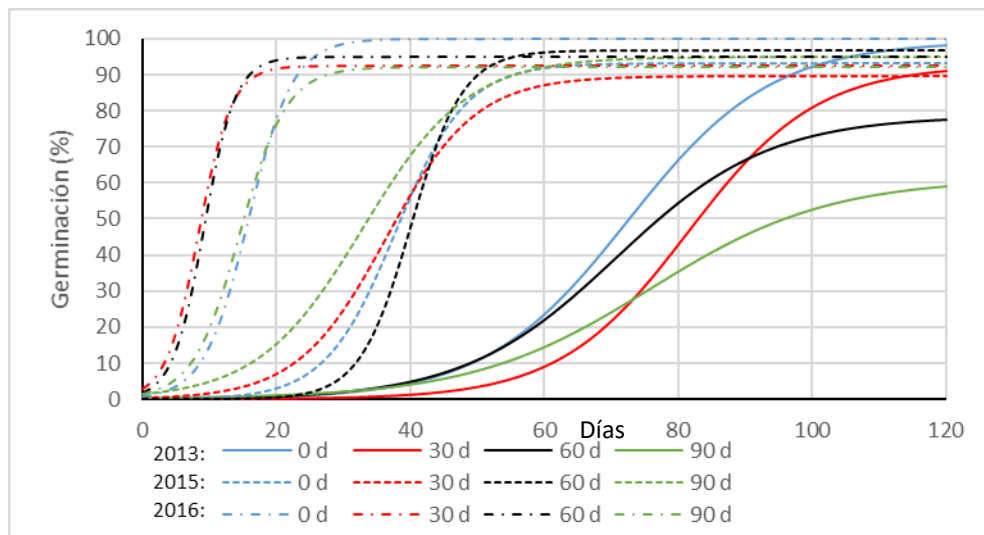


Figura 2.6.3.1. Modelo logístico ajustado a la germinación acumulada correspondiente a los valores medios de los cuatro períodos transcurridos entre la recolección y el inicio del ensayo de germinación.

En la tabla 2.6.3.2 se presenta el efecto del lote de semillas (año de su producción) y del período (número de días; DDR) transcurrido desde la recolección hasta el inicio del ensayo de germinación en la germinación acumulada (G , %), el máximo porcentaje de germinación (A , %), el número de días necesarios para alcanzar el 50% de la germinación final ($t_{50} = \beta/k$, d), y la velocidad media relativa de germinación acumulada ($k/2$, d^{-1}).

La germinación acumulada (G) y los parámetros A , y $k/2$, fueron afectados significativamente ($P \leq 0.01$) por los dos factores analizados, así como por su interacción (tabla 2.6.3.2), mientras que el parámetro t_{50} no resultó afectado ($P \leq 0.05$) por el factor DDR. El lote de semillas fue el factor que más influyó en t_{50} y $k/2$, suponiendo el 93 y el 75% de la variabilidad respectivamente, mientras que la interacción de los dos factores fue lo que más influyó en G (40%) y en A (44%).

Tabla 2.6.3.2. Influencia del lote de semillas (año de su producción; L) y del período (número de días) días transcurrido desde la recolección hasta el inicio del ensayo de germinación (DDR) en la germinación acumulada (G, %), el máximo porcentaje de germinación (A, %), el número de días necesarios para alcanzar el 50% de la germinación final ($t_{50} = \beta/k$, d), y la velocidad media relativa de germinación acumulada ($k/2$, d^{-1}).

		<i>G</i>	<i>A</i>	<i>t</i> ₅₀	<i>k</i> /2
L					
	2013	81.63 b	82.91 b	73.84 a	0.045 c
	2015	94.25 a	93.63 a	37.00 b	0.089 b
	2016	94.75 a	94.79 a	12.35 c	0.179 a
DDR					
	0	97.17 a	97.40 a	40.85	0.098 bc
	30	91.67 b	91.55 b	41.99	0.111 ab
	60	89.83 b	90.04 b	40.41	0.128 a
	90	82.17 c	82.79 c	41.01	0.081 c
Análisis de la Varianza					
Factores (grados de libertad)		% Suma de cuadrados			
L (2)		30.44 **	25.39 **	92.97 **	75.09 **
DDR (3)		23.80 **	24.04 **	0.05 NS	7.39 **
L x DDR (6)		40.28 **	43.82 **	2.27 *	6.06 *
Residual (36)		5.48	6.74	4.71	11.46
Desviación estándar (+)		2.98	3.18	6.56	0.025

Letras distintas en una misma columna indican diferencias ($p \leq 0,05$) según el test LSD. NS: no significativa. ** (*): nivel de significación $p \leq 0,01$ ($p \leq 0,05$). (+) La desviación estándar se ha calculado como la raíz cuadrada del cuadrado medio residual.

Del análisis de la interacción “Lote de semillas (año de su producción) x Período (número de días) días transcurrido desde la recolección hasta el inicio del ensayo de germinación (DDR)” (“L x DDR”; tabla 2.6.3.3) se desprende que en las semillas de 2013 y de 2016 la germinación (G y A) disminuyó al aumentar el periodo DDR, de manera significativa ($p \leq 0,05$), y con valores absolutos muy importantes en 2013, en cambio, la germinación no disminuyó en el lote de semillas de 2015. Estos resultados son acordes con la afirmación hecha anteriormente de que la germinación de las semillas

de *C. spinosa* en muy irregular (Pascual *et al.*, 2009), a pesar de que el porcentaje de germinación de las semillas recién recolectadas alcanzó valores próximos, y muy elevados, en los tres lotes. Mientras el porcentaje de germinación disminuyó de manera importante al aumentar el periodo de almacenamiento en un lote (2013), en otro lote disminuyó poco (2016), y en el otro nada (2015). Precisamente el lote de semillas en el que no se redujo la germinación con el almacenamiento (2015), obtuvo en el ensayo realizado tras la recolección (0 d), un valor de G inferior ($p \leq 0.05$) al de los otros lotes.

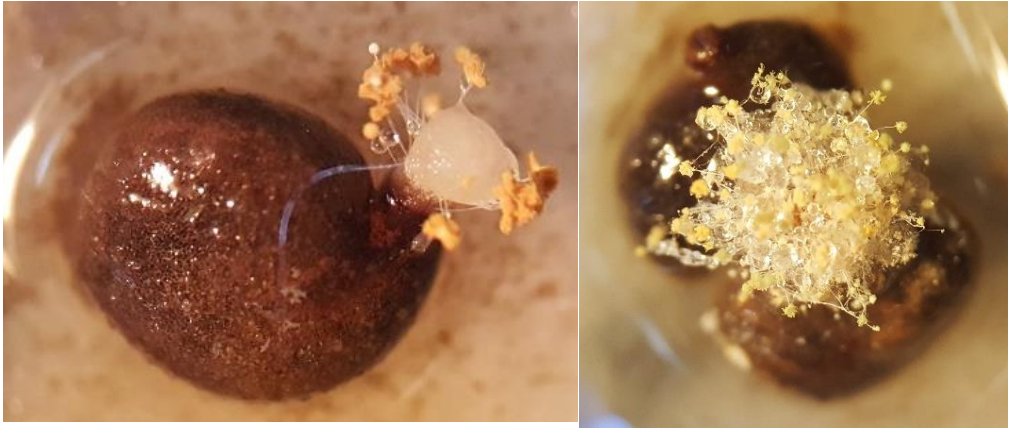
Tabla 2.6.3.3. Análisis del efecto de la interacción de la tabla 2.6.3.2: “lote de semillas (año de su producción; L) x período (número de días) días transcurrido desde la recolección hasta el inicio del ensayo de germinación (DDR)” en la germinación acumulada (G , %), el máximo porcentaje de germinación (A , %), el número de días necesarios para alcanzar el 50% de la germinación final ($t_{50} = \beta/k$, d), y la velocidad media relativa de germinación acumulada ($k/2$, d^{-1}).

		G	A	t_{50}	$k/2$
2013	0	98.50	99.28	67.46	0.048
	30	91.00	92.65	81.30	0.053
	60	77.50	78.42	71.26	0.043
	90	59.50	61.29	75.34	0.038
2015	0	94.00	93.11	37.79	0.095
	30	90.50	89.52	36.29	0.075
	60	97.50	96.86	40.82	0.128
	90	95.00	95.05	33.12	0.060
2016	0	99.00	99.82	17.30	0.150
	30	93.50	92.49	8.38	0.205
	60	94.50	94.85	9.14	0.215
	90	92.00	92.02	14.58	0.145
LSD		4.27	4.57	9.42	0.036

Al comenzar el ensayo de germinación el mismo día de la recolección (y por tanto inmediatamente después de la dehiscencia), no se ha iniciado el proceso de secado de las semillas, y por tanto su deterioro, por lo que la germinación de las semillas puede alcanzar casi el 100% (98.5% en 2013 y 99.0% en 2016). A medida que aumentó el periodo DDR, probablemente se inició y progresó el deterioro de las semillas (2.6.2.1), provocando un descenso de G, muy importante en las semillas de 2013, y de menor importancia en las de 2016. Los resultados obtenidos con los lotes de semillas de 2015 y 2016 son acorde con los obtenidos en el estudio de la longevidad de las semillas de esta tesis doctoral (apartado 2.6.2), mientras que el obtenido en el lote de 2013 es acorde con lo obtenido en diversos estudios realizados anteriormente (Pascual *et al.*, 2006 b; Mascarós, 2009), y particularmente con los resultados de Fernández (2015), que obtuvo porcentajes de germinación prácticamente nulos con lotes de semillas producidas en 2011 y 2012, mientras que obtuvo valores aceptables en lotes de semillas producidos en 2013, además de la existencia de semillas comerciales con germinación nula (Navarro, 2016).

Debe considerarse que bajo la denominación de DDR se incluyen dos conceptos que pueden influir de manera distinta en la germinación, por una parte, la fecha de recolección, que en realidad se refiere a la fecha de maduración de los frutos, y por otra, el período transcurrido entre la recolección y el inicio del ensayo de germinación. En cuanto a la fecha de la recolección, Pascual *et al.* (2003) concluyeron que las semillas procedentes de frutos obtenidos en las secciones basales de las ramas consiguieron mayor germinación que los de las posiciones apicales, lo que equivale a decir que al retrasar la recolección disminuye la germinación, lo que podría haber ocurrido en el lote de 2015, pero no en los de 2013 y 2016, en los que probablemente prevaleció el no deterioro de las semillas antes del inicio del ensayo de germinación. Para poder discriminar entre la fecha de recolección y el DDR como factores independientes, cada ensayo de germinación debería realizarse inmediatamente después de cada recolección, por lo que no se realizarían en la misma fecha, y por tanto las condiciones ambientales podrían no ser exactamente las mismas.

Por otra parte, el bajo porcentaje de germinación obtenido en el ensayo de germinación correspondiente a 90 DDR del lote de 2013, de acuerdo con Bewley y Bradford (2006), podría estar relacionado con la detección de una incipiente presencia de hongos (Fotografía 2.6.1), aparentemente provocada por una lixiviación de solutos de bajo peso molecular (posiblemente azúcares, aminoácidos, ácidos orgánicos, iones) debida probablemente a la rotura de membranas celulares externas, que podría haberse producido con el deterioro de las semillas, durante su almacenamiento. Esta lixiviación de solutos, incrementada con el deterioro de las semillas, estimula el crecimiento de hongos, que a su vez pueden invadir las semillas e incrementar su deterioro (Bewley y Bradford, 2006). En éste, como en algún otro ensayo de germinación realizado, se ha observado, generalmente relacionado con un exceso de humedad en el sustrato (papel de filtro), la lixiviación de los citados solutos, formando una especie de mucílago alrededor de la cubierta de la semilla (seguida en ocasiones de la aparición de hongos), que, de acuerdo con Heydecker y Orphanos (1968) y Ramezani-Gask *et al.* (2008), podría provocar una falta de oxígeno y consecuentemente una deficiente germinación de las semillas, a pesar de que todos los ensayos de germinación se realizaron con la adición de AG₃ al sustrato, y que según Negbi (1966) y Ramezani-Gask *et al.* (2008), la GAs reduce los requerimientos de oxígeno para la germinación, posiblemente al incrementarse la eficiencia de la respiración como fuente de energía. Al lixiviar este mucílago colocando las semillas bajo un chorro de agua (Fotografía 2.6.2) el proceso de la germinación continuó con relativa normalidad.



Fotografía 2.6.1. Lixiviación de solutos y presencia de hongos durante el ensayo de germinación.



Fotografía 2.6.2. Lixiviación del mucílago producido en determinados ensayos de germinación

En cuanto al tiempo necesario para la germinación del 50% de las semillas, únicamente existieron diferencias ($P \leq 0.05$) en el lote de 2013, obteniéndose el menor valor en el ensayo iniciado 30 días después de la recolección, y el menor valor en el ensayo iniciado inmediatamente después de la recolección de las semillas. Respecto a la velocidad media relativa de germinación acumulada, existieron diferencias significativas ($P \leq 0.05$) en los lotes de 2015 y 2016, pero no en el de 2013. Los valores de $k/2$ del lote de 2016 (y del ensayo iniciado 30 días tras la recolección de las semillas de 2015), fueron muy superiores a los correspondientes a 2013 (y a los otros periodos DDR de 2015), por lo que lógicamente las diferencias entre los valores de los diferentes ensayos también fueron mayores, resultando superiores al valor del LSD, y por tanto las significativas ($P \leq 0.05$), lo que no ocurrió en las semillas de 2013.

2.6.3.4. Conclusiones

Con la adición de AG_3 al sustrato e iniciando la realización del ensayo de germinación inmediatamente después de la recolección, se alcanzan porcentajes de germinación muy próximos al 100%.

La germinación de algunos lotes de semillas disminuye de forma importante al retrasar el inicio del ensayo, por lo que no es aconsejable retrasar más de 30 días el ensayo de germinación, para obtener, de esta manera, porcentajes de germinación superiores al 90%.

2.7. INFLUENCIA DEL TRATAMIENTO DE LAS SEMILLAS DE *CAPPARIS SPINOSA* L. SUBSP. *RUPESTRIS* CON RADIACIÓN LÁSER HE-NE E INCUBACIÓN ENZIMÁTICA, EN LA GERMINACIÓN DE LAS MISMAS

2.7.1. Introducción

En diversos estudios realizados por el grupo de investigación en el que se enmarca esta tesis doctoral, se analizó el efecto de diversos métodos para superar la hipotética latencia física de las semillas de *C. spinosa* subsp. *rupestris* y aumentar su germinación; concretamente se estudió el efecto de la escarificación [química (con SO_4H_2), térmica (en seco y en agua), mecánica (con papel de lija), física (con ultrasonidos), y enzimática (con Driselasa); Pascual *et al.*, 2004] y del remojo (Pascual *et al.*, 2009), pero no se había estudiado la irradiación de las semillas con láser de baja intensidad, y en el caso de la escarificación enzimática únicamente se había ensayado la Driselasa. El objetivo de este apartado de la tesis doctoral es estudiar la influencia de la radiación láser He-Ne sobre la germinación de las semillas de *C. spinosa* L. subsp. *rupestris* y el crecimiento posterior de las plántulas correspondientes, y el efecto de la incubación enzimática de estas semillas con el complejo celulase from *Trichoderma reesei* (CTR) en la germinación de estas semillas.

2.7.2. Influencia de la radiación láser he-ne sobre la germinación de las semillas de *C. spinosa* L. subsp. *rupestris* y el crecimiento de la radícula e hipocótilo

2.7.2.1. Introducción

Cuando algunas semillas presentan problemas de latencia o están sometidas a condiciones estresantes que retrasan o inhiben su germinación, el tratamiento de las mismas con métodos físicos estimulantes, como las radiaciones ionizantes, los campos magnéticos o la radiación láser de baja potencia, pueden estimular su germinación (Álvarez, *et al.*, 2011). La utilización de métodos físicos para el tratamiento de semillas puede resultar más rentable y beneficioso en relación a otros métodos empleados (Jamil *et al.*, 2013). Entre los métodos físicos utilizados para mejorar la germinación, la estimulación de la germinación mediante radiación láser, ha resultado positiva en la germinación de semillas y en el crecimiento posterior de las plántulas, en algunas especies de interés comercial (Costilla-Hermosillo *et al.*, 2010; Hernández *et al.*, 2010), siendo un método adecuado para acelerar el proceso de germinación de las semillas, respetuoso con el medio ambiente (Jamil *et al.*, 2013).

La irradiación de semillas con láser de baja intensidad puede reducir el tiempo necesario para la germinación, obteniéndose un incremento en la biomasa y en el vigor de las plántulas, debido a que entre sus principales funciones está la activación de la división celular, que a su vez conduce a una tasa más rápida de crecimiento inicial, y finalmente a un incremento en la productividad y calidad de la producción de plantas (Podlešny *et al.*, 2012).

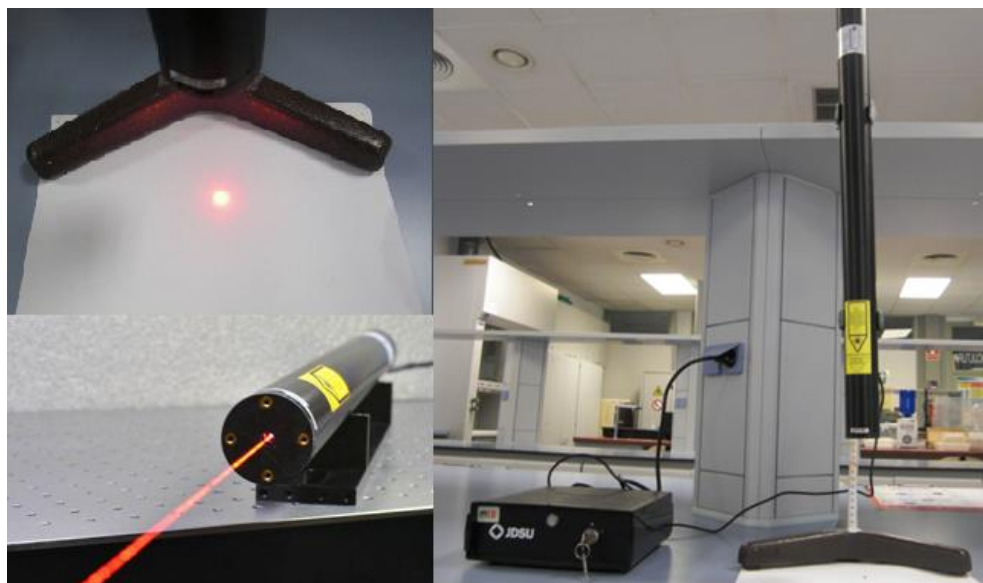
El término láser es acrónimo de *Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation*. Un láser es un dispositivo que produce un haz de luz con ciertas propiedades que lo hacen diferente a cualquier otro tipo de iluminación convencional. La aplicación de radiación láser es habitual en

casi todas las ramas de la ciencia y la tecnología, desempeñando un importante papel en diferentes campos de la sociedad, incluyendo la agricultura (Hernández *et al.*, 2010). El procedimiento permite irradiar a una parte de la testa de la semilla, afectando positivamente a determinadas propiedades mecánicas, como la resistencia al aplastamiento y a la tensión, por parte de las cubiertas de las semillas (Koper y Podleśny, 1999).

2.6.2.2. Material y métodos

El estudio se inició en enero de 2013, utilizando semillas de un lote conservado en un bote de vidrio hermético, en condiciones de laboratorio, procedente de frutos recolectados en la primera semana de agosto de 2012.

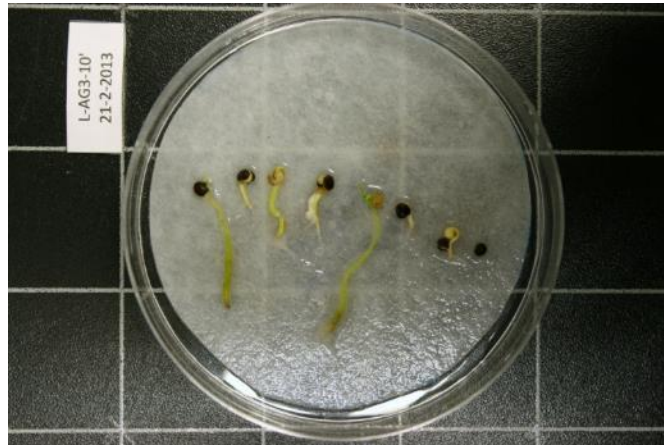
Las semillas se irradiaron con un equipo láser de He-Ne (1145 JDSU; Fotografía 2.7.2.1), con potencia de emisión de 25 mW, longitud de onda de 632.28 nm (banda roja del espectro), con un haz circular 0.7 cm de diámetro y con una densidad de potencia de 65 Mw cm⁻². Los periodos de exposición fueron: 0 (control), 10, 30, 60 y 120 s.



Fotografía 2.7.2.1. Láser He-Ne, 1145 JDSU.

Tras la irradiación se realizó el ensayo de germinación según se ha descrito en 2.2.3, humedeciendo el sustrato (papel de filtro) con una solución de AG_3 (500 mg L^{-1}) y con agua destilada. Se realizaron cuatro 4 repeticiones (ISTA, 2007), utilizando 50 semillas por repetición.

A partir de las semillas germinadas se estudió la elongación de la radícula y del hipocótilo de las plántulas correspondientes. Las semillas germinadas (de cada repetición y día de conteo del ensayo de germinación) se colocaron en una nueva placa Petri, manteniendo húmedo el sustrato con la solución de AG_3 , o en su caso, agua destilada. Transcurridos diez días se realizó un registro fotográfico de las plántulas presentes en cada placa Petri (Fotografía 2.7.2.2).



Fotografía 2.7.2.2. Elongación de radícula e hipocótilo de las plántulas de las semillas germinadas.

Para el análisis del crecimiento de la radícula y del hipocótilo de las plántulas, se utilizó el programa digital para el tratamiento de imágenes *Image Tools for Windows Versión 3.0* (The University of Texas Health Science Center, San Antonio, Texas, USA).

2.7.2.3. Resultados y discusión

El ajuste de los datos obtenidos en las 40 placas Petri (5 tiempos x 2 soluciones para humedecer el sustrato x 4 repeticiones) al modelo logístico, resultó estadísticamente significativo ($P \leq 0,05$), con coeficientes de determinación (R^2) comprendidos entre 89.30 y 99.98 %. En la figura 2.7.2.1 se muestra el modelo logístico ajustado a la germinación acumulada correspondiente a los valores medios para las diferentes dosis de irradiación láser (a) y la adición de AG_3 al sustrato (b).

Los valores de G y A son bajos en comparación a los valores obtenidos en otros lotes de semillas, aunque se eligieron semillas de las que

se esperaba una elevada germinación, tanto por su edad, medio año, como por la época de recolección, agosto. No obstante, esta baja germinación no resulta extraordinaria, puesto tal y como se ha citado (Pascual *et al.*, 2003), y se ha constatado en los diversos estudios de esta tesis doctoral, la germinación de las semillas de *C. spinosa* es muy irregular.

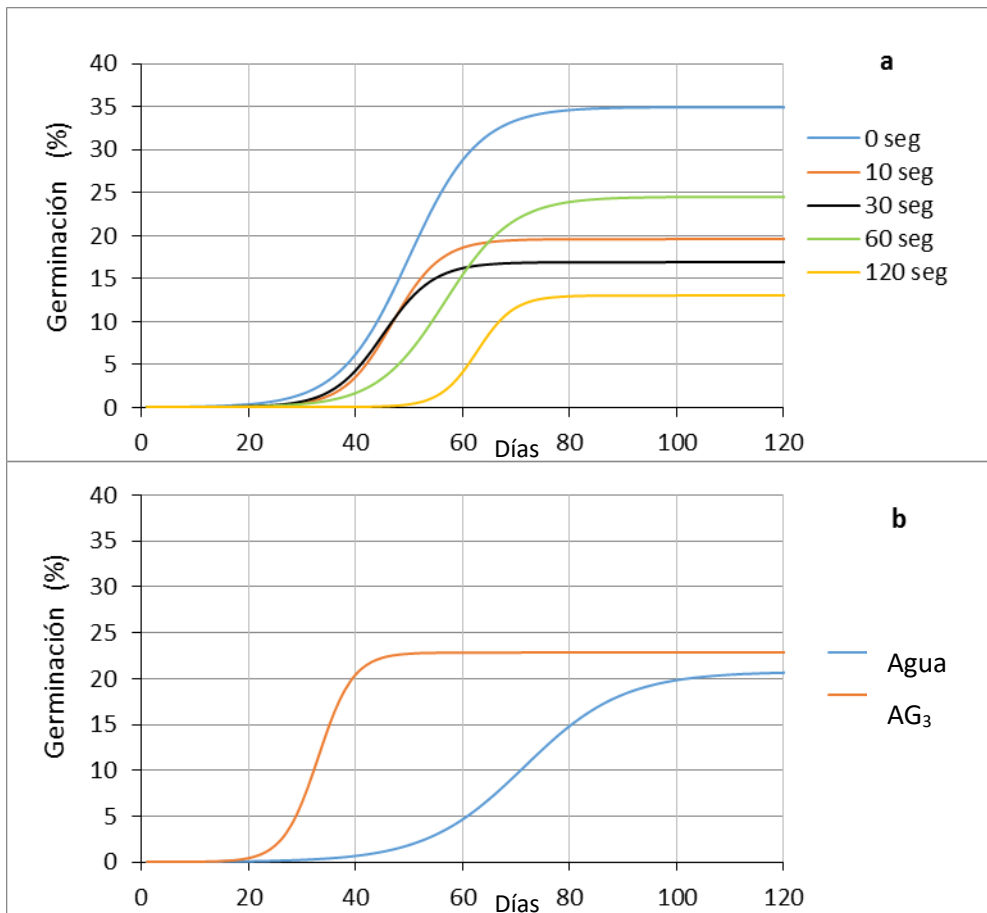


Figura 2.7.2.1. Modelo logístico ajustado a la germinación acumulada correspondiente a los valores medios para las diferentes dosis de irradiación láser (0, 10, 30, 60 y 120 s; a) y la adición de AG₃ al sustrato (b).

La germinación (tanto G como A), resultó afectada ($P \leq 0.01$) por la dosis de irradiación láser (duración de la irradiación; DI), suponiendo el 45% de la variabilidad de G y el 58% de A, mientras que los parámetros t_{50} y $k/2$) se vieron afectados ($P \leq 0.01$) por la adición de AG_3 al sustrato, suponiendo el 45% y el 31% de las respectivas variabilidades (Tabla 2.7.2.1). La interacción “DI x Adición de AG_3 al sustrato” no afectó ($P \leq 0.05$) a ninguno de los parámetros estudiados.

Tabla 2.7.2.1. Influencia de las diferentes dosis de irradiación láser (Duración de la Irradiación, DI; s) y de la adición de AG_3 al sustrato, en la germinación acumulada (G, %), el porcentaje máximo de germinación (A, %), el número de días necesarios para alcanzar el 50% de la germinación final (t_{50}) (β/k , d) y la velocidad media relativa de germinación acumulada ($k/2$, d^{-1}).

	G	A	t_{50}	$k/2$
Duración irradiación (DI)				
0 s	34.37 a	34.90 a	49.99	0.08
10 s	19.68 b	19.68 bc	46.82	0.11
30 s	18.12 b	16.94 c	45.10	0.11
60 s	24.68 b	24.54 b	56.65	0.08
120 s	21.33 b	13.05 c	62.71	0.15
AG_3				
Agua	21.84	20.75	71.50 a	0.05 a
AG_3	25.44	22.89	33.00 b	0.15 b
Análisis de la Varianza				
Factores (grados de	% Suma de cuadrados			
DI (4)	45.14**	58.49**	5.19NS	7.87NS
AG_3 (1)	4.36	1.18	44.84**	31.38**
DI x AG_3 (4)	3.89NS	0.65NS	4.66NS	0.27NS
Residual (30)	46.61	39.67	45.30	60.48
Desviación estándar ⁽⁺⁾	6.79	7.16	22.34	0.08

Letras distintas en una misma columna indican diferencias ($p \leq 0.05$) según el test LSD **: nivel de significación $p \leq 0.01$. (+) La desviación estándar se ha calculado como la raíz cuadrada del cuadrado medio residual.

La radiación láser no sólo no mejoró el porcentaje de germinación (G y A) sino que incluso lo redujo ($p \leq 0.05$), no existiendo diferencias ($P \leq 0.05$) entre las diferentes DI. Estos resultados están en la línea de los obtenidos por Álvarez *et al.*, (2011) en un estudio realizado en el cv. HA3019, híbrido de tomate (*Solanum lycopersicum* L.), en el que obtuvieron que la radiación láser de baja potencia no provocó cambios significativos ($P \leq 0.05$) en la germinación de sus semillas, observando un ligero decrecimiento del porcentaje de germinación de las semillas a partir de los 30 s de irradiación, apuntando que esta disminución podría ser más severa (significativa) al incrementar el tiempo de irradiación. No obstante, Álvarez *et al.*, (2011) concluyeron que las semillas con alto poder germinativo reaccionan de forma débil al tratamiento con métodos físicos estimulantes (como las radiaciones ionizantes, los campos magnéticos o la radiación láser de baja potencia) y que la estimulación de la germinación se logra cuando las semillas presentan problemas de latencia o están sometidas a condiciones estresantes que retrasan o inhiben su germinación. Evidentemente, en el presente estudio, en el que las semillas control de *C. spinosa* presentaron una baja germinación, debida supuestamente a problemas de latencia, cabía esperar una mejora en el porcentaje de germinación, que, a la vista de los resultados, no tuvo lugar.

Podleśny *et al.* (2012) estudiando la irradiación láser de semillas del cv. *Albus* de habas (*Vicia faba* L.) y del cv. *Katon* de altramuza blanca (*Lupinus albus* L.) obtuvieron una germinación más precoz y uniforme en las semillas de las dos especies; la irradiación incrementó la actividad de las enzimas amilolíticas, el número de radicales libres y el contenido de ácido indol-acético (AIA). De acuerdo con Chen *et al.* (2005), la radiación láser He-Ne provoca un incremento de la actividad enzimática y acelera las reacciones catalizadas por las enzimas, debido a un campo electromagnético y a la energía térmica que afecta a las células, y aumenta su actividad biológica. Perveen *et al.* (2010) también encontraron un efecto positivo en la actividad de las enzimas amilasa y proteasa en semillas de girasol (*Helianthus annuus* L.) irradiadas con láser. Estos autores concluyeron que la radiación láser afecta a los parámetros termodinámicos de las semillas,

que influyen de forma importante en la actividad de enzimas y en la germinación de las semillas. La radiación láser puede incrementar la energía interna de las semillas (Podleśny *et al.*, 2012), que provoca un incremento de la concentración de enzimas en los cotiledones y un mayor metabolismo celular.

La imbibición o fase inicial de la germinación, se produce paralelamente a un incremento de la respiración (Hartmann *et al.*, 2002). Podleśny *et al.* (2012) constataron que, en el proceso de la imbibición, el peso de las semillas irradiadas aumentó más rápido que el de las no irradiadas, lo que supone que la radiación láser de baja potencia incrementó la absorción de agua. Los sustratos de la respiración en la germinación son sustancias de reserva y su movilización comienza durante la imbibición. No obstante, la mayor parte de las reservas están en forma de compuestos macromoleculares, que para ser utilizados en el metabolismo necesitan ser hidrolizados. Este proceso es catalizado por las enzimas amilolíticas que catalizan la hidrólisis de polisacáridos, como el almidón; por ello son tan importantes las enzimas durante la primera fase de la germinación. La dinámica de la germinación de las semillas está correlacionada con la actividad de la enzima amilasa, observándose una aceleración de la germinación de las semillas de altramuz blanco y de habas (Podleśny *et al.*, 2012). El AIA desempeña un papel importante en el proceso de la germinación de las semillas. Podleśny *et al.* (2012) constataron un incremento considerable de la concentración de AIA en las semillas tras ser irradiadas con láser, siendo conocido que las auxinas actúan en el crecimiento de la pared celular, influyendo en las propiedades de la membrana, así como en la síntesis de enzimas y en su activación (Tillberg, 1977). Parece que el AIA es importante en la división y crecimiento celular que tiene lugar en el crecimiento del embrión, y que su contenido en las semillas puede incrementarse con la radiación láser (Podleśny *et al.*, 2012).

Se han obtenido resultados positivos en la germinación de semillas, de diversas especies, irradiadas con láser He-Ne, como, por ejemplo: en los cv. 93-4736 y S-24 de trigo (*Triticum aestivum* L.; Rong *et al.*, 2002, y Jamil *et al.*, 2013,

respectivamente), en isatide (*Isatis indigotica* Fortune ex Lindl; Chen *et al.*, 2005), y en *Albizia lebbbeck* (L.) Benth (Cepero *et al.*, 2002).

La respuesta (positiva o no) puede depender de la longitud de onda e intensidad de la radiación láser, ya que la actividad enzimática puede mejorar dentro de un cierto rango de longitud de onda, pero fuera del mismo esta actividad puede retardarse (Zhang *et al.*, 2011). Costilla-Hermosillo *et al.*, (2010) irradiaron semillas de *Stenocactus multicosatus* (Hilman ex K. Schumann) Berger, durante 30, 60, 90, 120 y 150 s con láser He-Ne, y únicamente destacaron, con respecto al control, el efecto bio-estimulador conseguido con el tratamiento de 150 s. El resultado también puede depender de las condiciones ambientales; así, Muszyński y Gladyszewska (2008) encontraron una mejora de la germinación de las semillas del cv. *Pola* de rábano (*Raphanus sativus* L.) irradiadas con láser He-Ne, únicamente a la temperatura de 20°C, pero no a la de 15°C.

Por otra parte, distintas especies pueden responder al mismo tratamiento de forma diferente, ya sea por su constitución fisiológica o sus propios mecanismos de germinación y crecimiento. En este sentido, se ha comprobado que la radiación láser de He-Ne no siempre tiene un efecto positivo sobre las semillas. Prośba-Biaczyk *et al.*, (2013) no obtuvieron ninguna influencia significativa en la capacidad de germinación de las semillas de remolacha (*Beta vulgaris* L.) irradiadas con láser (670 nm, 200mV) respecto a las semillas control. Ritambhara y Girjesh (2013) al irradiar semillas del cv. *Pusa-24* de almorta (*Lathyrus sativus* L.) con láser He-Ne (632,8 nm), observaron que el porcentaje de germinación de las semillas tratadas solo mejoró (sin significación estadística, $P \leq 0.05$), con respecto al control, con el tratamiento de 0.5 min, pero no con los restantes tratamientos (1 y 1.5 min).

En contra de lo que es habitual en los ensayos de germinación realizados en esta tesis doctoral (apartados 2.4 y 2.8), la adición de AG₃ al sustrato no aumentó significativamente ($P \leq 0.05$) la germinación, aunque sí que redujo ($P \leq 0.01$) los parámetros t_{50} y $k/2$.

Varios investigadores han estudiado el crecimiento de la raíz, del hipocótilo o de ambos, en semillas previamente tratadas mediante irradiación láser (Prošba-Biaczyk *et al.*, 2013; Álvarez *et al.*, 2011). Los resultados del crecimiento en longitud de la raíz e hipocótilo de las semillas germinadas obtenidos en el presente experimento se presentan en la tabla 2.7.2.2.

Prácticamente más de la mitad (valores medios entre 47 y 73%) de las semillas que germinaron, tuvieron crecimiento posterior (% de plántulas elongadas), tanto en las semillas control (66%) como las tratadas (desde 57 a 65%). La radiación He-Ne no afectó significativamente ($P \leq 0.05$) al porcentaje de plántulas que crecieron, ni al tamaño medio o máximo de las plántulas, contribuyendo únicamente en valores del 5, 4 o 17% de las respectivas variabilidades (Tabla 2.7.2.2). En cambio, el AG₃ sí que influyó significativamente ($P \leq 0,01$) en el porcentaje de plántulas elongadas, disminuyendo su valor (del 73% al 48%) con la adición de AG₃.

En diversos estudios se ha comprobado el efecto positivo que la irradiación de las semillas con láser He-Ne, ha ejercido sobre el crecimiento de las plántulas. Semillas de remolacha azucarera irradiadas con láser He-Ne incrementaron la longitud de la raíz, hipocótilo y cotiledones, con respecto a las semillas control (Prošba-Biaczyk *et al.*, 2013). Podlešny *et al.*, (2012) obtuvieron un incremento significativo ($P \leq 0,05$) en la longitud de la raíz y del hipocótilo de las plántulas de haba y de altramuz irradiadas con láser a diferentes dosis. En promedio, se obtuvieron unos incrementos de 27 y 24% en la longitud de las raíces de las plántulas obtenidas de semillas irradiadas con respecto de las no irradiadas, en semillas de altramuces y de habas, respectivamente. En cuanto al incremento que obtuvieron en la longitud del hipocótilo de las plántulas procedentes de las semillas irradiadas fue de 10.6 y 11.4 mm en las habas y los altramuces, respectivamente. La estimulación pre-siembra con láser influyó positivamente en el crecimiento y el desarrollo de plantas en semillero, en relación a las plantas desarrolladas a partir de semillas no irradiadas (Álvarez *et al.*, 2011). Estos autores obtuvieron incrementos ($P \leq 0.05$) en la longitud de la raíz de las semillas de tomate irradiadas, existiendo un pico de estimulación correspondiente a 20 s de exposición de las semillas a la

radiación láser He-Ne, mostrando también las dosis de 5 y 10 s una estimulación significativa ($P \leq 0.05$) con relación al control; en cambio, las exposiciones superiores a 20 s no provocaron cambios significativos en la longitud de la raíz. Costilla-Hermosillo *et al.* (2010) obtuvieron un mayor tamaño de las plántulas (7.5 ± 1.3 mm) y mayor longitud de las raíces (3.4 ± 1.5 mm) de las plántulas procedentes de semillas de *Stenocactus multicostratus* irradiadas con láser He-Ne, que los de las semillas control (4.0 ± 1.3 mm y 2.3 ± 1.7 mm), respectivamente, aunque estos autores no hacen referencia al nivel de significación estadística.

Tabla 2.7.2.2. Influencia de las diferentes dosis de irradiación láser y de la adición de AG₃ al sustrato, en el porcentaje de plántulas elongadas, la longitud media de las plántulas (raíz + hipocótilo) y la longitud de la plántula (raíz + hipocótilo) de mayor tamaño.

	% Plántulas	Longitud	Longitud
Duración irradiación (DI)			
0 s	65.95	8.00	24.12 a
10 s	52.96	7.94	13.62 b
30 s	65.32	7.27	12.12 b
60 s	56.88	7.72	17.87 ab
120 s	59.11	9.39	17.18 ab
AG ₃			
Agua	72.73 a	8.27	19.28
AG ₃	47.36 b	7.87	14.68
Análisis de la Varianza			
Factores (grados de	% Suma de cuadrados		
DI (4)	5.36 NS	4.43 NS	16.92 NS
AG ₃ (1)	34.86**	0.35 NS	5.16 NS
DI x AG ₃ (4)	10.84 NS	10.35 NS	9.49 NS
RESIDUAL (39)	48.93	84.86	68.42
Desviación estándar (+)	17.35	3.59	9.67

Letras distintas en una misma columna indican diferencias ($p \leq 0,05$) según el test LSD. NS: no significativa. **: nivel de significación $p \leq 0,01$. (+) La desviación estándar se ha calculado como la raíz cuadrada del cuadrado medio residual.

El comportamiento de la adición de AG₃ al sustrato resultó similar al obtenido en anteriores trabajos de investigación. Ortiz (2001) obtuvo que la aplicación de Promalina (CK + GA) a semillas de *Echinacea angustifolia* DC. Disminuyó la elongación radicular respecto a las semillas control, aunque se ha de tener presente la posible interacción con la CK. Inada y Shimmen (2000) obtuvieron que la aplicación exógena de AG₃ a segmentos extraídos de raíces de lenteja de agua (*Lemna minor* L.) no promovió la elongación radicular, sino que la inhibió; el AG₃ incrementó la desorganización de los microtúbulos corticales, lo que indujo la inhibición de la elongación de la raíz. Estos autores concluyeron que la GA endógena controla el crecimiento de la raíz, al regular la elongación celular. Balaguera-López *et al.*, (2009) estudiaron, entre otros parámetros morfológicos, la longitud de la raíz de las plántulas procedentes de semillas de tomate, del cv. *Daniela*, embebidas durante diferentes tiempos en soluciones a distintas concentraciones de AG₃. Evaluaron el efecto de los diferentes tratamientos y concluyeron que, a las concentraciones ensayadas, el AG₃ inhibió en cierto grado el crecimiento radicular, y que la respuesta positiva en el crecimiento de la raíz se debió a las bajas concentraciones AG₃ junto con el mayor tiempo de imbibición.

La irradiación de las semillas de alcaparra con láser He-Ne parece que no mejora la germinación en relación a las semillas control; no obstante, convendría realizar el repicado de las plántulas procedentes de semillas irradiadas y obtener plantas adultas para analizar su comportamiento, dado que algunos parámetros biológicos, como el rendimiento productivo (Álvarez *et al.*, 2011; Delibaltova, e Ivanova, 2006; Podlešny, 2007), son susceptibles de ser modificados por la radiación láser. Asimismo, es posible la incidencia de posibles cambios morfogénéticos inducidos por mutaciones, tal y como obtuvieron Ritambhara y Girjesh (2013) en estudios realizados en la almorta. Estos autores concluyeron que la radiación láser He-Ne puede ser una herramienta eficaz para incrementar la variabilidad de rasgos agronómicos en la almorta. Por otra parte, como se ha indicado anteriormente, la radiación láser puede aumentar la concentración de radicales libres, cuyo incremento en los órganos aprovechados en la

alimentación podría limitar su utilización; no obstante, Podlesny *et al.* (2012) indican que, en estudios realizados anteriormente, encontraron que la concentración de radicales libres es similar en las semillas producidas por plantas procedentes de semillas irradiadas o no.

2.7.2.4. Conclusiones

- La radiación láser He-Ne, con las densidades y periodos de exposición ensayados, no mejora la germinación de las semillas de *Capparis spinosa* L. subsp. *rupestris*, sino que provoca un menor porcentaje de germinación que en las semillas control.
- La duración del tratamiento de irradiación láser no ha afectado al tamaño de las plántulas.
- Las plántulas procedentes de las semillas irradiadas y germinadas en sustrato humedecido con AG₃, presentan un menor tamaño que las semillas germinadas en sustrato humedecido con agua.

2.7.3. EFECTO DE LA INCUBACIÓN ENZIMÁTICA EN LA GERMINACIÓN DE LAS SEMILLAS DE *Capparis spinosa* L. subsp. *rupestris*

2.7.3.1. Introducción

Los hongos del género *Trichoderma* producen metabolitos secundarios, como péptidos, terpenos, pironas y derivados indólicos, que desempeñan diferentes funciones y tienen una importante aplicación potencial en agricultura (Contreras-Cornejo *et al.*, 2016), de hecho, diversas especies de *Trichoderma* se han utilizado con éxito mejorando la resistencia de varias plantas a estreses bióticos y abióticos, la absorción de nutrientes, el crecimiento de la planta y el rendimiento (López-Bucio *et al.*, 2015; Contreras-Cornejo *et al.*, 2016; Fiorini *et al.*, 2016; Nieto-Jacobo *et al.*, 2017; Rubio *et al.*, 2017; Téllez Vargas *et al.*, 2017; Xue *et al.*, 2017).

Desde hace mucho tiempo se sabe que determinados microorganismos ejercen un efecto positivo en la germinación de semillas. Bradbeer (1988) indicó que en el pasado algunos autores habían mencionado de pasada la degradación de la cubierta de las semillas en el suelo, pero sin aportar evidencias. En 1934, Pfeiffer (Morpeth y Hall, 2000) encontró que para la germinación de las semillas de *Symphoricarpos racemosus* (baya de nieve) era necesario la presencia de hongos o de otros agentes capaces de descomponer fibra, y concluyó que era posible que los hongos intervinieran en la desintegración de las capas duras de otras semillas.

Posteriormente se ha demostrado la mejora de la germinación de akenios del género *Rosa*, mediante el remojo en una suspensión con microorganismos (*Klebsiella oxytoca*; Lee *et al.*, 2010), o la incubación con diversos productos microbianos, a base de bacterias fototrópicas (*Rhodospseudomonas*), *Lactobacillus*, *Saccharomyces*, y varias especies de

Azotobacter (Kazaz *et al.*, 2010). También es conocido el efecto positivo de varias especies de *Trichoderma* en la germinación de semillas. Mastouri *et al.* (2010) estudiaron el efecto de la cepa T22 de *Trichoderma harzianum* en la germinación de las semillas y el crecimiento posterior de las plántulas del cv. Jubilee de tomate (*Lycopersicum esculentum* L.), constatando que cuando las semillas no estaban sometida a estrés, la cepa T22 no tenía prácticamente efecto, pero cuando las semillas estaban sometidas a estrés, osmótico, salino o debido a temperaturas subóptimas, la acción de esta cepa provocaba una germinación más rápida y uniforme. Estos autores concluyeron que la cepa T22 de *T. harzianum* incrementa el vigor de las plántulas y mejora la tolerancia al estrés, al inducir en las plantas una protección fisiológica contra daños oxidativos. Wu *et al.* (2017) han constatado un incremento de la germinación, vigor y velocidad de germinación en semillas de berenjena (*Solanum melongena* L.) acondicionadas con *Trichoderma harzianum* en matriz sólida (*solid matrix priming*). En estudios realizados con semillas de *Opuntia streptacantha*, Delgado-Sánchez *et al.* (2010) concluyeron que *T. harzianum* y *T. koningii* pueden promover la germinación de las semillas de esta especie, ayudando a romper su latencia, probablemente debido al ataque que realizan las enzimas sobre la testa, reduciendo la resistencia mecánica que ésta ofrece a la germinación en las semillas que presentan latencia fisiológica. Posteriormente, Delgado-Sánchez *et al.* (2011) concluyeron las que imágenes obtenidas con microscopio electrónico mostraban que *T. koningii* erosionaba el funículo, reduciendo su resistencia.

Al igual que la incubación de aquenios de rosa con diversos productos microbianos, la maceración enzimática de los mismos (con Driselasa, Yambe y Takeno, 1992; con celulasa, Conev y Sandhu, 2015) también ha mejorado su germinación. La aplicación exógena de microorganismos y de enzimas inducen al debilitamiento y la disolución de la pared celular, debilitando a su vez los enlaces, provocando la división del pericarpio del aquenio a lo largo de una sutura a medida que avanza la germinación (Yambe y Takeno, 1992). La disolución de las paredes celulares y el debilitamiento de los enlaces entre las células de las cubiertas de las semillas puede disminuir la restricción mecánica que las cubiertas

ofrecen al embrión, de manera que éste sea capaz de extenderse, produciéndose la germinación (Yambe y Takeno, 1992; Welbaum *et al.*, 1998; Orozco-Segovia *et al.*, 2007).

Tanto la testa como el tegmen de las semillas de *C. spinosa* poseen lignina (Corner, 1967). Análisis realizados en las semillas de lotes producidos por el equipo de investigación, han confirmado la presencia de celulosa, hemicelulosa y de lignina, representando del orden del 17, 10 y 30%, respectivamente, de la materia seca de las semillas. Dada la presencia de estos compuestos en la cubierta de las semillas de *C. spinosa*, se creyó interesante intentar su escarificación enzimática.

La celulosa es un homopolisacárido compuesto por unidades de β -glucosa unidas por enlaces β -1,4-glucosídicos. Existen tres grandes grupos de celulasas (enzimas que hidrolizan la celulosa): endoglucanasas, celobiohidrolasas y β -glucosidasas que producen, respectivamente, oligosacáridos, celobiosa y glucosa. El mecanismo de acción enzimático se inicia con las endoglucanasas, que hidrolizan aleatoriamente los enlaces β -1,4-glucosídicos de la molécula de celulosa. Al disminuir el tamaño de las cadenas, se favorece el acceso a las celobiohidrolasas, que hidrolizan las moléculas de celulosa desde los extremos no reductores, produciendo celobiosa. Finalmente, las β -glucosidasas hidrolizan la celobiosa en glucosa (Figura 2.7.3.1; Kumar *et al.*, 2008).

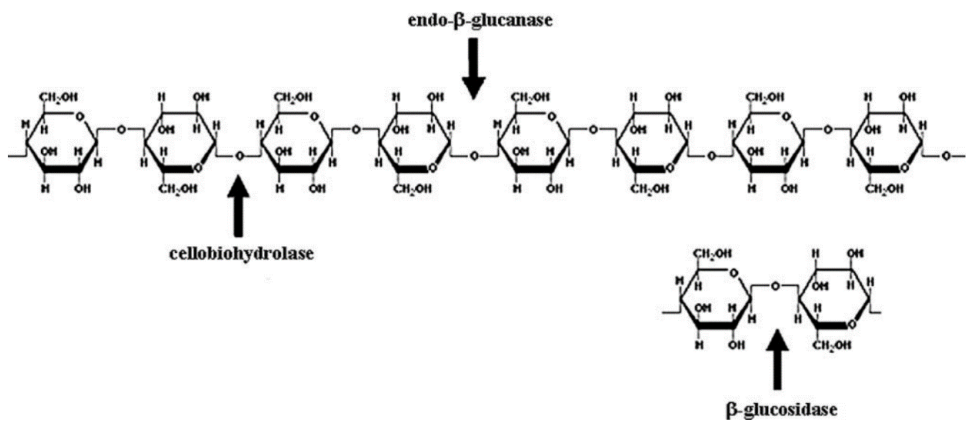


Figura 2.7.3.1. Estructura molecular de la celulosa y zonas de acción de las endoglucanasas, celobiohidrolasas y β-glucosidasas. De Kumar *et al.*, 2008.

La hemicelulosa forma parte de las paredes de las células vegetales, recubre la superficie de las fibras de celulosa y permite el enlace de pectina; representa del 25 al 35% de la biomasa lignocelulósica. Las hemicelulosas son heteropolisacáridos, formados a su vez por un solo tipo de monosacáridos, unidos por enlaces β-1,4, fundamentalmente pentosas (xilosa, arabinosa), hexosas (manosa, glucosa, galactosa) y ácido glucurónico. Existen varias enzimas responsables de la degradación de la hemicelulosa (Figura 2.7.3.2; Kumar *et al.*, 2008).

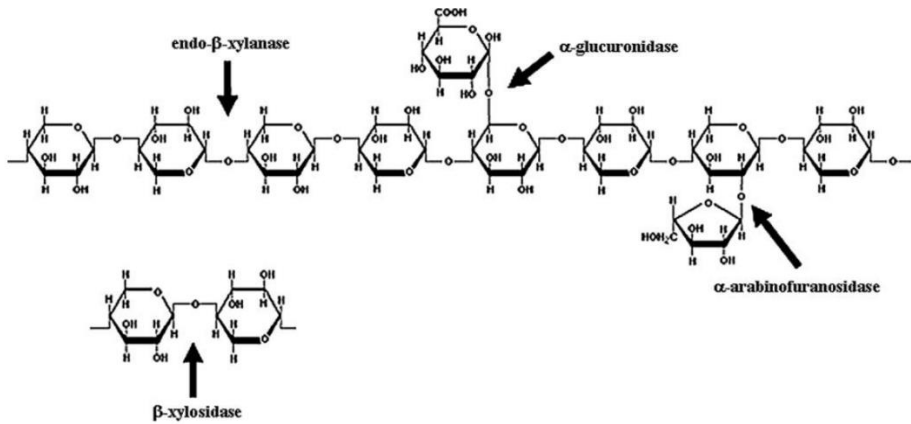


Figura 2.7.3.2. Estructura química de la hemicelulosa y zonas de acción de las enzimas hidrolíticas que intervienen en su degradación. De Kumar *et al.*, 2008.

La lignina, es una clase de polímero orgánico complejo, presente en todas las plantas vasculares, que junto a la celulosa y hemicelulosa forma parte de las paredes celulares, a las que proporciona rigidez. Dada la complejidad de su aislamiento, y del análisis de su composición, no existe una definición clara, como la de la celulosa, al existir múltiples unidades estructurales que no se repiten de forma regular, sino que la composición y estructura varían dependiendo de su origen (Chávez-Sifontes y Domine, 2013). Las ligninas, en general, son copolímeros que se derivan principalmente de tres unidades fenilpropanomonoméricas (monolignoles) básicas: alcohol p-cumarílico, alcohol coniferílico, y alcohol sinapílico (Chávez-Sifontes y Domine, 2013).

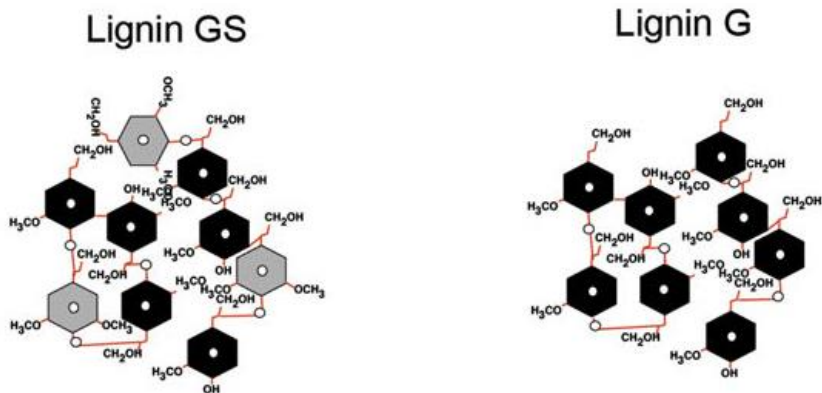


Figura 2.7.3.3. Estructura química de la lignina con unidades de guaiacyl (G) y syringyl (S) (Sarkar *et al.*, 2009).

Trichoderma reesei es un hongo adcomiceto, mesófilo y filamentoso, que tiene la capacidad de segregar grandes cantidades de enzimas celulíticos, celulasas (generalmente clasificadas como endoglucanasas, celobiohidrolasas y β -glucosidasas; Ortega *et al.*, 2001) y hemicelulasas, y que por fermentación sumergida produce el denominado complejo enzimático “Cellulase from *Trichoderma reesei*” (Celulasa de *Trichoderma reesei*; CTR). El complejo enzimático conocido comercialmente como Driselasa es producido por *Basidiomicetos* sp., y tiene actividad lítica: celulasas (endoglucanasas, celobiohidrolasas y β -glucosidasas), laminarinasas (hidrolizan enlaces glicosídicos β -1-3), xilanasas (hidroliza enlaces β -1-4-D-xilopiranosas) y pectinasas (López Encina, 1996). Los mecanismos de acción de ambos mecanismos se presentan en las figuras 2.7.3.4, 2.7.3.5, 2.7.3.6 y 2.7.3.7 (Sigma-Aldrich, 2017).

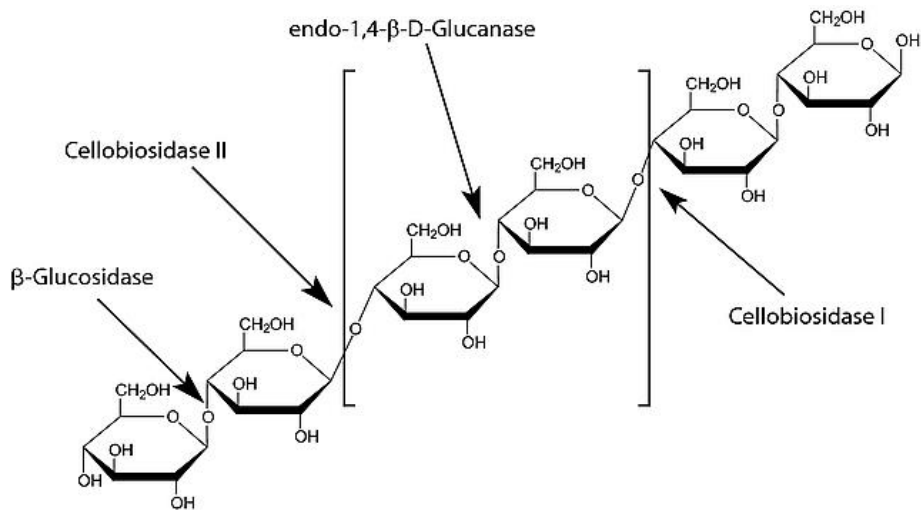


Figura 2.7.3.4. Mecanismo de acción del complejo enzimático Cellulase from *Trichoderma reesei*. (Sigma-Aldrich, 2017).

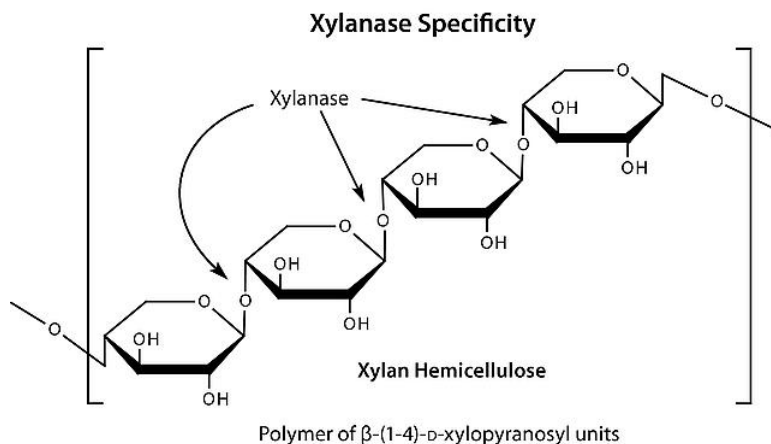


Figura 2.7.3.5. Mecanismo de acción del complejo Driselasa a través de la enzima xilanasa (Sigma-Aldrich, 2017).

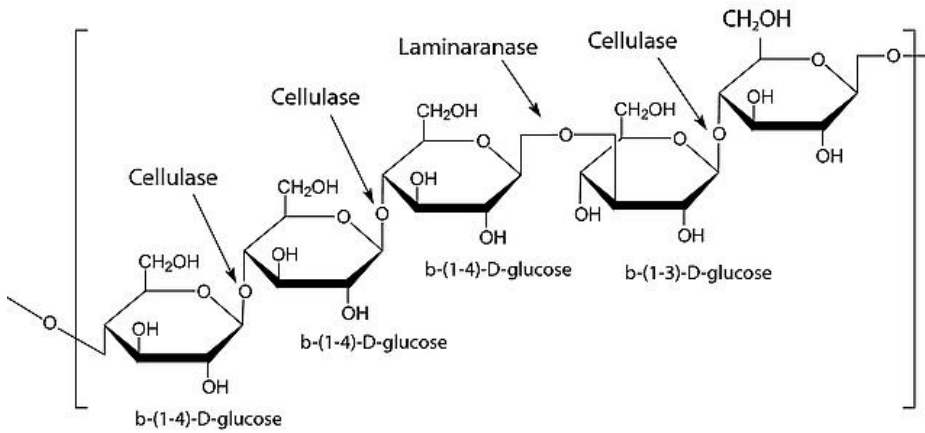


Figura 2.7.3.6. Mecanismo de acción del complejo Driselasa a través de las enzimas celulasa y laminaranasa (Sigma-Aldrich, 2017)..

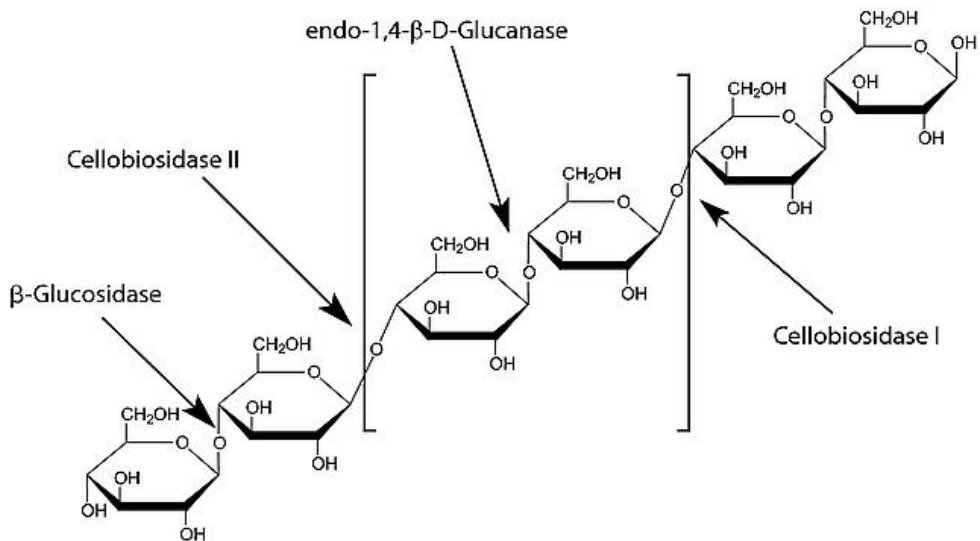


Figura 2.7.3.7. Mecanismo de acción de Driselasa por enzimas endoglucanasas, celobiosidasas y β -glucosidasas (Sigma-Aldrich, 2017).

Además de los estudios indicados anteriormente, cabe citar que la escarificación enzimática con Driselasa también ha mejorado la germinación de las semillas de *C. spinosa* (Pascual *et al.*, 2004). La escarificación mediante la incubación enzimática es uno de los métodos menos utilizados en la escarificación de las semillas en general, y particularmente en las semillas de alcaparra, debido probablemente a la complejidad del procedimiento, y a su elevado coste en relación a los otros métodos de escarificación. El objetivo de este apartado de la tesis doctoral es estudiar el efecto de la incubación enzimática con el complejo CTR, en la germinación de las semillas de *C. spinosa* L. subsp. *rupestris*, y comparar este efecto con el producido por la Driselasa, ya conocido.

2.7.3.2. Material y métodos

Antes de iniciar el proceso de incubación enzimática, y tras el ensayo de germinación, se realizó un test de viabilidad de las semillas, siguiendo la metodología presentada en 2.2.2. En el test realizado antes de iniciar el proceso de incubación se realizaron 4 repeticiones de 20 semillas, mientras que, tras el ensayo de germinación, el test de viabilidad se realizó a todas las semillas que no habían germinado.

Para estudiar el efecto de los complejos enzimáticos en la escarificación de las semillas se realizaron dos experimentos. En el primero se ensayó el complejo CTR (Cellulase from *Trichoderma reesei* ATCC 26921; Fotografía 2.7.3.1), producido por fermentación sumergida de una cepa seleccionada del hongo *Trichoderma reesei*, que según catálogo cataliza la descomposición de celulosa en glucosa, celobiosa y polímeros de glucosa superiores, y del que no se tenía constancia de que se hubiera utilizado anteriormente en la escarificación de semillas de ninguna especie, con el objetivo de comparar su efecto con el del complejo enzimático Driselasa (Driselase® from Basidiomicetes D9515; Fotografía 2.7.3.1), que ya se había utilizado en semillas de *C. spinosa* (Pascual *et al.*, 2004),

ensayando dos tiempos de aplicación de los complejos. La metodología utilizada en cuanto a concentración, temperatura y pH, se basó en la utilizada por Ortega *et al.* (2001) en la sacarificación de celulosa con *Trichoderma reesei*, y por Park *et al.* (2010) al estudiar el efecto de varias enzimas comerciales, en la hidrólisis de la celulosa de residuos de papel de oficina, utilizado como sustrato. Las enzimas son pH dependientes, con un óptimo de actuación de 4 a 6 (López Encina, 1996), y su temperatura óptima es de 40 a 60°C (Park *et al.*, 2002; 2010), pero dado que estas elevadas temperaturas pueden afectar a la viabilidad de las semillas, se optó por realizar la incubación a pH 5, y temperatura de 35°C, utilizando agitadores magnéticos con calefacción marca Falc modelo F-60.

Una vez conocido el resultado positivo obtenido con el complejo CTR en relación a la Driselasa, se realizó un segundo experimento, ensayando cuatro concentraciones en dos tiempos de aplicación.



Fotografía 2.7.3.1. Complejo enzimático Cellulase from *Trichoderma reesei* ATCC 26921 y Driselase® from Basidiomycetes D9515 utilizados.

2.7.3.2.1. Experimento 1. Efecto de los complejos enzimáticos Driselasa y *Trichoderma reesei*

El ensayo se inició a principios de abril de 2015, utilizándose semillas obtenidas de frutos recolectados en octubre de 2014. Las reacciones enzimáticas fueron conducidas en matraces Erlenmeyer de 250 mL, conteniendo 60 mL de una solución *buffer* (pH 5.0) de 0.1 M de citrato-fosfato con 7 g de semillas en cada matraz. Para los tratamientos con Driselasa (concentración = 0.5%) se añadieron 0.3 g del complejo (Driselase® from Basidiomicete s, D9515; Sigma-Aldrich), mientras que para los tratamientos con CTR (concentración = 12.5%) se disolvieron 7.5 mL del complejo (CTR ATCC 26921, Sigma-Aldrich), incubados a 35°C durante 60 y 120 horas, con agitación permanente a 50 rpm. Tras la escarificación se realizó el ensayo de germinación, humedeciendo el sustrato con una solución de AG (500 mL L⁻¹; Pascual *et al.*, 2004) durante el proceso de germinación, utilizándose controles, tanto de la escarificación como de la solución con que se humedeció el sustrato. Paralelamente al ensayo de germinación, se determinó el contenido de las semillas en celulosa, hemicelulosa y lignina, antes y después de la escarificación, siguiendo el protocolo señalado por Van Soest *et al.* (1991).

El ensayo de germinación se realizó según se ha indicado en 2.2.3 (ISTA, 2007), utilizando 50 semillas en cada placa Petri. El diseño factorial fue 3 x 2 x 2, con cuatro repeticiones por tratamiento, considerando como primer factor al complejo enzimático (CTR, Driselasa, Control), como segundo factor el tiempo de incubación (60 y 120 h), y como tercer factor la adición de la solución al sustrato (AG₃, agua destilada).

2.7.3.2.2. Experimento 2. Efecto de distintas concentraciones del complejo de *Trichoderma reesei*

Se ensayaron cuatro concentraciones del complejo CTR (6.25, 12.5, 18.75 y 25%) incubadas durante 30 y 60 horas, a 35°C y pH 5. Tras la escarificación se realizó el ensayo de germinación, según lo descrito en el experimento 1. Dado que con la incubación cambiaba el color de la solución, se midió el mismo con un colorímetro portátil Minolta, modelo CR-300 (con medidas sobre un área circular de 8 mm de diámetro). De cada matraz correspondiente a cada tratamiento se extrajeron 50 mL de solución, que fueron trasvasados a placas Petri, en las que se realizaron los disparos sobre la superficie líquida de cada extracto, obteniendo las Coordenadas Hunter L, a, b (Figura 2.7.3.8; HunterLab, 2012).

- L: indica la luminosidad del color de la superficie medida, variando desde 0 (negro ideal) hasta 100 (blanco ideal).
- La coordenada a mide la diferencia de luz reflejada entre las zonas verde (-100) y roja del espectro (+100).
- La coordenada b corresponde a la diferencia de reflexión entre las zonas del azul (-100) y amarillo (+100).

$$L = 100$$



$$L = 0$$

Figura 2.7.3.8. Escala de colores opuestos. Coordenadas Hunter L, a, b.

El colorímetro se programó con tres disparos por medida (promediada para cada lectura), habiendo sido calibrado previamente al inicio de cada análisis. Una vez obtenidas estas coordenadas, se calculó el valor Croma expresado como $(a^2 + b^2)^{1/2}$ (Prono-Widayat *et al.*, 2003) que permite cuantificar la evolución de las tonalidades desde amarillentas a rojizas que van adoptando las soluciones con los complejos enzimáticos en función del tiempo.

Para analizar el efecto escarificador del complejo enzimático CTR, se determinó el contenido de las semillas en celulosa, hemicelulosa y lignina, siguiendo el método de Van Soest *et al.*, (1991), y para completar este apartado, se determinó el contenido en sólidos solubles totales de las soluciones correspondientes a cada concentración y tiempo de incubación, con un refractómetro digital ATAGO Palette PR-32 (con control de temperatura y sensibilidad 0,01 ° Brix), previamente calibrado con agua destilada; se realizaron tres medidas por solución, expresándose el resultado como el valor medio de las tres lecturas en ° Brix.

El diseño factorial fue 5 x 2, con cuatro repeticiones por tratamiento, considerando como primer factor la concentración del complejo enzimático (0, 6.25, 12.5, 18.75 y 25%), y como segundo factor el tiempo de escarificación (30 y 60 h).

2.7.3.3. Resultados y discusión

2.7.3.3.1. Experimento 1. Efecto de los complejos enzimáticos Driselasa y *Trichoderma reesei*

En todos los casos (48), el ajuste de los datos de germinación al modelo logístico, resultó estadísticamente significativo ($p \leq 0,01$), con coeficientes de determinación (R^2) superiores a 97%, lo que confirma que

también en este experimento, la función logística es adecuada para analizar la germinación de las semillas de alcaparra tal y como ocurrió en anteriores estudios sobre la germinación de las semillas de *C. spinosa* (Pascual *et al.*, 2003; Pascual *et al.*, 2004; Pascual *et al.*, 2006; Pascual *et al.*, 2009) y en los diferentes apartados de esta tesis doctoral.

En las figuras 2.7.3.9, 2.7.3.10 y 2.7.3.11 se presentan las curvas ajustadas correspondientes a los valores medios de los tres factores analizados en el experimento 1. Los dos complejos enzimáticos (Figura 2.7.3.9), la mayor duración de la incubación (Figura 2.7.3.10) y la adición de AG₃ al sustrato (Figura 2.7.3.11) incrementaron y adelantaron la germinación con respecto al control.

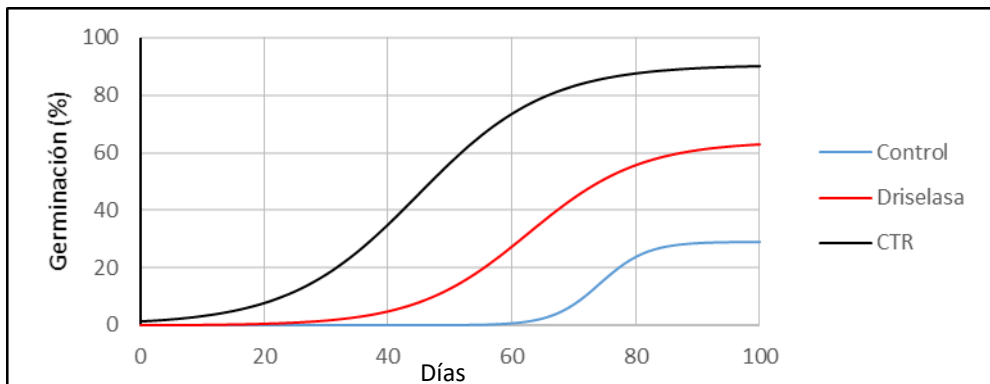


Figura 2.7.3.9. Modelo logístico ajustado a la germinación acumulada correspondiente a los valores medios de los complejos enzimáticos, del experimento 1, Driselasa y *Trichoderma reesei*.

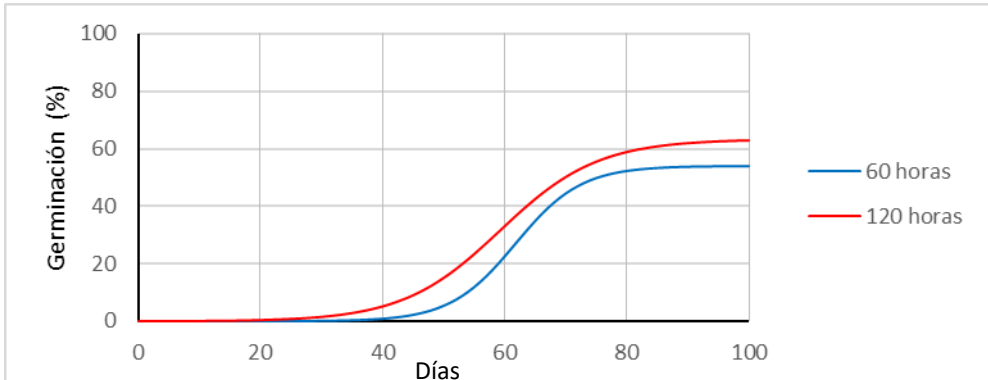


Figura 2.7.3.10. Modelo logístico ajustado a la germinación acumulada correspondiente a los valores medios de los tiempos de aplicación de los complejos enzimáticos, del experimento 1.

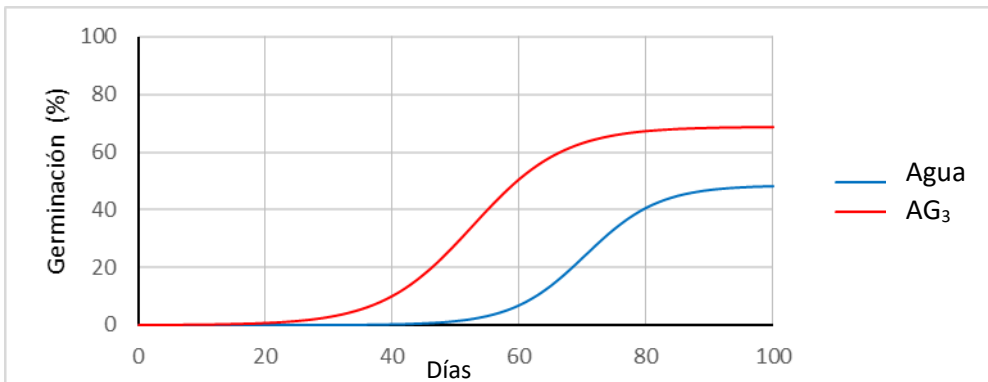


Figura 2.7.3.11. Modelo logístico ajustado a la germinación acumulada correspondiente a los valores medios de la adición de AG₃ al sustrato, del experimento 1.

Todos los parámetros evaluados fueron afectados significativamente ($P \leq 0.01$) por el complejo enzimático utilizado (Tabla 2.7.3.1), por el tiempo de incubación, por la adición de AG₃ al sustrato, así como por sus interacciones [$P \leq 0.01$ ($P \leq 0.05$ en el efecto de la interacción “Tiempo de incubación x Adición de AG₃” en G y en $k/2$)]. El factor que más influyó sobre la germinación acumulada (G) y sobre el máximo porcentaje de

germinación (A) fue el complejo enzimático, representando el 75% de la variabilidad de G (78% de A), seguido de la adición de AG₃, 9% (12% de A), y del tiempo de incubación, 8% (3% de A). El resultado obtenido con la adición de AG₃ al sustrato coincide con los resultados obtenidos en estudios anteriores, aumentando significativamente ($P \leq 0.01$) los valores de G y de A respecto al control (Pascual *et al.*, 2003; Pascual *et al.*, 2004; Pascual *et al.*, 2006).

A la vista de los resultados parece que el volumen de solución utilizado fue acorde con el peso de las semillas utilizadas para conseguir la actividad enzimática del complejo CTR, así como que también fueron adecuados los valores de la concentración, la temperatura y el pH de la solución en la incubación.

Con el complejo CTR se obtuvo mayor germinación (G y A) que con la Driselasa ($P \leq 0.05$), que a su vez fue mayor que en el control ($P \leq 0.05$; Tabla 2.7.3.1, Figura 2.7.3.9). El tiempo de incubación resultó más importante en el tratamiento control y en el de Driselasa que en el de CTR (Tabla 2.7.3.2), es decir que cuando más efectivo resultó el tratamiento, menos importante resultó el tiempo de incubación. Al pasar de 60 a 120 h en el tratamiento control, también se incrementó significativamente la germinación ($P \leq 0.05$; Tabla 2.7.3.2, Figura 2.7.3.12), por lo que cabe pensar, que el efecto positivo no se debió exclusivamente al efecto del complejo enzimático, sino que también el remojo con agua (incluida la agitación), ejerció un efecto importante en la germinación posterior de las semillas.

Tabla 2.7.3.1. Efecto del complejo enzimático (CE), del tiempo de la incubación enzimática (T; h) y de la adición de AG3 al sustrato (AG3), en la germinación acumulada (G, %), máximo porcentaje de germinación (A, %), número de días necesarios para alcanzar el 50% de la germinación final ($t_{50} = \beta/k$, días) y velocidad media relativa de germinación acumulada ($k/2$, d-1), del experimento 1.

	G	A	t_{50}	$k/2$
Complejo enzimático (CE)				
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 incubación (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
AG₃				
Agua	52.92 b	48.64 b	69.39 a	0.09 a
AG ₃	71.71 a	68.78 a	51.61 b	0.07 b

Análisis de la Varianza

Factores (grados de libertad)	% Suma de cuadrados			
CE (2)	74.91 **	77.85 **	51.82 **	46.53 **
T (1)	8.35 **	2.75 **	0.56 **	7.92 **
AG ₃ (1)	9.06 **	12.47 **	28.00 **	2.31 **
CE x T (2)	2.01 **	2.94 **	1.07 **	33.53 **
CE x AG ₃ (2)	4.49 **	2.64 **	15.09 **	8.45 **
T x AG ₃ (1)	0.17 *	0.75 **	1.30 **	0.02 *
Residual (36)	1.01	0.60	2.16	1.24

Desviación estándar (+) 3.525 2.474 2.773 0.007

Letras distintas en una misma columna indican diferencias ($p \leq 0.05$) según el test LSD. *nivel de significación $p \leq 0.05$ ** nivel de significación $p \leq 0.01$. (+) La desviación estándar se ha calculado como la raíz cuadrada del cuadrado medio residual.

Tabla 2.7.3.2. Análisis de las interacciones significativas de los análisis de la varianza de la tabla 2.7.3.1, complejo enzimático (CE), tiempo de la escarificación (T; h), adición de AG₃ al sustrato (AG₃), en la germinación acumulada (G; %), máximo porcentaje de germinación (A), número de días necesarios para alcanzar el 50% de la germinación final t₅₀ (d) y velocidad media relativa de germinación acumulada (k/2) del experimento 1.

		<i>G</i>	<i>A</i>	t ₅₀	<i>k/2</i>
CE x T	Control - 60 h	19.00	18.84	74.95	0.190
	Control - 120 h	38.00	39.24	73.39	0.071
	Driselasa - 60 h	49.63	50.87	66.15	0.056
	Driselasa - 120 h	78.00	62.19	58.99	0.054
	CTR - 60 h	91.25	92.24	44.18	0.034
	CTR - 120 h	98.00	88.89	45.36	0.063
	LSD (p ≤ 0.05)	3.57	2.51	2.81	0.007
CE x AG ₃	Control - Agua	10.00	12.94	91.75	0.161
	Control - AG ₃	47.00	45.14	56.59	0.100
	Driselasa - Agua	57.13	47.25	69.78	0.055
	Driselasa - AG ₃	70.50	65.81	55.36	0.055
	CTR - Agua	91.63	85.72	46.64	0.043
	CTR - AG ₃	97.63	95.41	42.90	0.054
	LSD (p ≤ 0.05)	3.57	2.51	2.81	0.007
T x AG ₃	60 h - Agua	45.17	46.38	68.73	0.104
	120 h - Agua	60.67	50.89	70.05	0.068
	60 h - AG ₃	61.42	61.58	54.79	0.083
	120 h - AG ₃	82.00	75.98	48.44	0.057
	LSD (p ≤ 0.05)	2.91	2.05	2.29	0.01

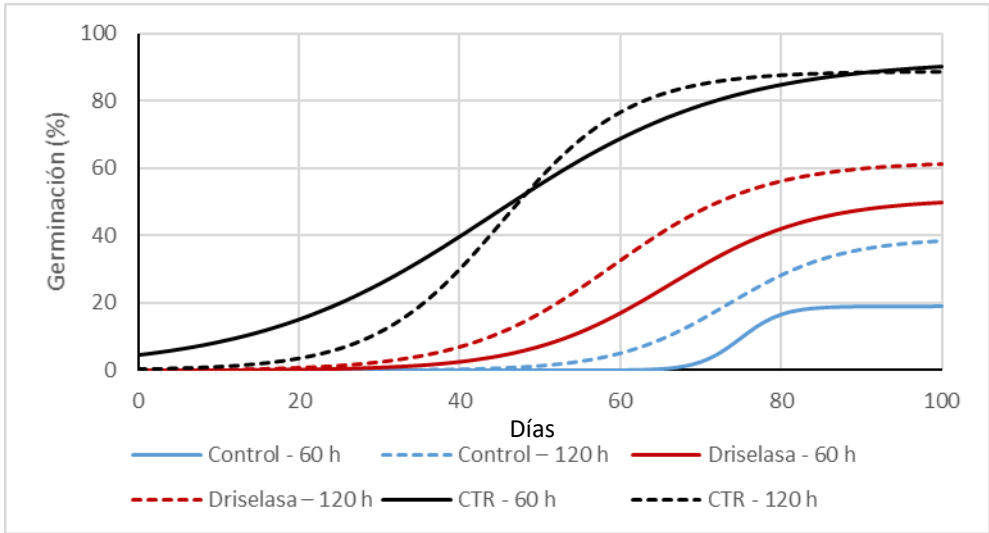


Figura 2.7.3.12. Modelo logístico ajustado a la germinación acumulada correspondiente a los valores medios de la interacción “Complejo enzimático x Tiempo de incubación”, del experimento 1.

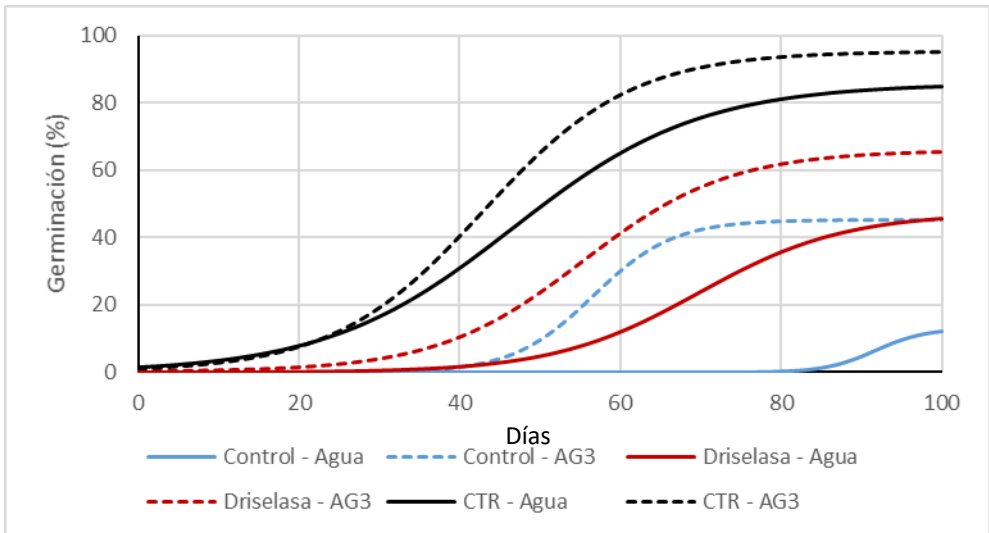


Figura 2.7.3.13. Modelo logístico ajustado a la germinación acumulada correspondiente a los valores medios de la interacción “Complejo enzimático x Adición de AG₃ al sustrato”, del experimento 1.

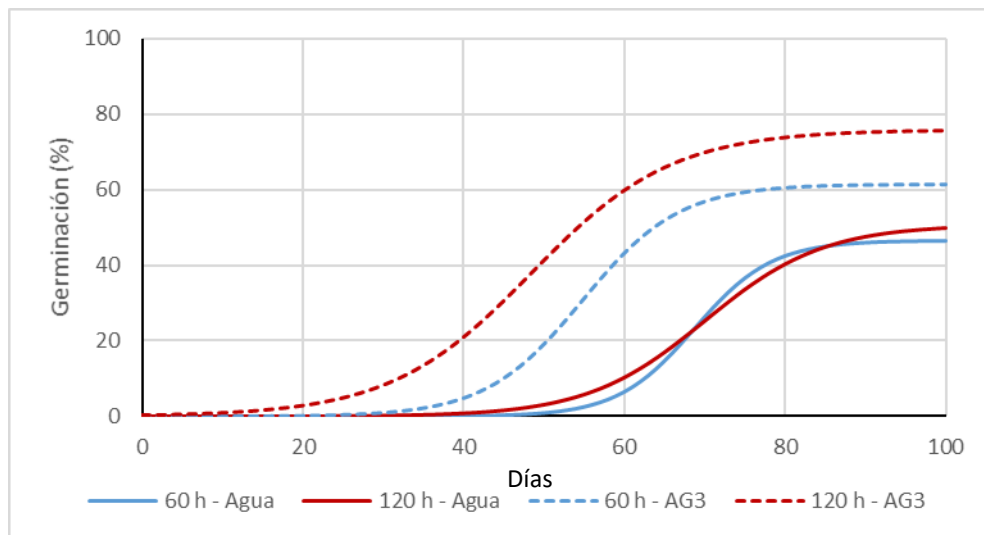


Figura 2.7.3.14. Modelo logístico ajustado a la germinación acumulada correspondiente a los valores medios de la interacción “Tiempo de incubación x Adición de AG₃ al sustrato”, del experimento 1.

La adición de AG₃ al sustrato también incrementó en mayor medida la germinación en el tratamiento control que en la Driselasa (Tabla 2.7.3.2; Figura 2.7.3.13), y a su vez este incremento fue mayor que el obtenido con CTR (Tabla 2.7.3.2; Figura 2.7.3.13), de lo que se deduce que la adición de AG₃ resultó más efectiva cuanto menos efectiva fue la incubación enzimática. Estos resultados parecen lógicos, ya que en definitiva el tratamiento con AG₃ desencadena una acción enzimática, y por tanto puede complementar a la acción obtenida con los complejos enzimáticos ensayados. En efecto, Groot y Karssen (1987) en un estudio realizado con el cv. Moneymaker de tomate (*Lycopersicon esculentum* L.) y con genotipos de esta misma especie deficientes en AG, concluyeron que las GAs regulan la germinación de estas semillas, siendo su principal acción el debilitar las células del endospermo que rodean al ápice de la radícula, y que las GAs endógenas facilitan la germinación al disminuir la resistencia mecánica que ofrece el endospermo a la protrusión de la radícula. Posteriormente, Groot et al (1988) en estudios realizados con el mismo material vegetal concluyeron que el debilitamiento del endospermo, previo a la protrusión de la radícula, está mediado por la degradación enzimática de las paredes celulares ricas en

manosa, y que, a su vez, esta degradación enzimática está inducida por GAs. Estos investigadores concluyeron que la incubación de las semillas en GA₄₊₇ indujo la actividad de endo- β -mananasa, no detectada cuando la incubación se realizó en agua; también detectaron un incremento de las actividades de mano-hidrolasa y α -galactosidasa con respecto al control, en cambio no detectaron actividad celulasa, que es precisamente la principal actividad del complejo CTR.

El resultado obtenido con la adición de AG₃ al sustrato coincide con los resultados obtenidos en estudios anteriores, aumentando significativamente ($P \leq 0.01$) los valores de G y de A respecto al control (Pascual *et al.*, 2003; Pascual *et al.*, 2004; Pascual *et al.*, 2006), pero no con los obtenidos por Ramezani-Gask *et al.* (2008), que obtuvieron que el AG₃, a diferentes concentraciones, únicamente afectó a la germinación de semillas de alcaparra, cuando éstas habían sido previamente escarificadas con ácido sulfúrico, pero no cuando se había aplicado como tratamiento único (sin escarificación previa). En este sentido, en los estudios de Groot y Karssen (1987) la GA₄₊₇ resultó mucho más eficaz que el AG comercial en la inducción de la germinación de las semillas. Phinney (1985) había presentado evidencias que confirmaban la idea generalizada de que la GA₄ es la principal GA endógena que es activa *per se* en el control del crecimiento por elongación en muchas angiospermas, y que otras GAs endógenas que se comportan como activas, muestran esta actividad tras ser convertidas en GA₁. Groot *et al.* (1988) concluyeron que GA₄ y/o GA₇ son biológicamente activas o son fácilmente convertidas a una GA activa en el endospermo. Por todo ello convendría ensayar la germinación de las semillas de *C. spinosa* con la adición de GA₄₊₇ al sustrato de germinación.

Los tres factores analizados y sus respectivas interacciones influyeron significativamente ($P \leq 0.01$) en el valor de t_{50} , explicando el complejo enzimático el 52% de la variabilidad total (Tabla 2.7.3.1). La incubación con CTR durante 60 h (120 h) adelantó la germinación, reduciendo en un 38% (41%) el t_{50} , mientras que en el complejo Driselasa lo disminuyó en un 12% (20%), respecto del control. Del análisis de la tabla 2.7.3.2 se desprende que los menores valores de t_{50} correspondieron a la incubación con CTR y la adición de AG al sustrato. El tiempo de incubación de la Driselasa influyó significativamente, reduciéndose ($P \leq 0.05$) el valor de

t_{50} al aumentar el tiempo de incubación (Tabla 2.7.3.2). La reducción del valor de t_{50} conseguida con la adición de AG₃ al sustrato fue menor con la incubación con CTR que con Driselasa, que a su vez fue menor que con la incubación con agua (Tabla 2.7.3.2).

El factor que más influyó también sobre la velocidad media relativa de germinación acumulada ($k/2$) fue el complejo enzimático, representando el 47% de su variabilidad, siendo de destacar también la interacción “Complejo enzimático x Tiempo de incubación”, que representó el 34% de la citada variabilidad (Tabla 2.7.3.1). El valor de $k/2$ aumentó ($P \leq 0.05$) con el periodo de incubación con CTR, pero no con Driselasa (Tabla 2.7.3.2); de igual manera, la adición de AG₃ al sustrato, aumentó el valor de $k/2$ ($P \leq 0.05$) tras la incubación con CTR, pero no tras la incubación con Driselasa (Tabla 2.7.3.2).

Los resultados obtenidos con el complejo Driselasa son similares a los obtenidos por Pascual *et al.* (2004) utilizando el mismo complejo y, por tanto, tal y como concluyeron estos autores, superan a los obtenidos en la mayoría de los tratamientos de las semillas de *C. spinosa*, tanto en los estudios realizados en España (Pascual *et al.*, 2004; 2006, 2009) como en el extranjero: 38% Macchia y Casano (1993); 48% Yildirim (1998); 50% Rinaldelli (2000); 53% Tansi (1999); 68% Sozzi y Chiesa (1995); 80% Orphanos (1983). No obstante, estos resultados son superados por los obtenidos con el complejo CTR (Tablas 2.7.3.1 y 2.7.3.2; Figura 2.7.3.12).

En los diversos modelos desarrollados para predecir la germinación de las semillas en respuesta de la germinación al potencial hídrico (*hydrothermal time*) se constata que el momento de la germinación (emergencia de la radícula), y por tanto t_{50} , está estrechamente relacionado con el potencial hídrico (Welbaum *et al.*, 1998). Además, en ocasiones los tejidos que rodean al embrión, endospermo y cubierta, ejercen una resistencia a la expansión del embrión, que resulta determinante en el potencial hídrico de las semillas y por tanto en la germinación (Welbaum *et al.*, 1998). Por ello, el debilitamiento enzimático de estos tejidos puede resultar clave en la germinación y en el tiempo necesario para que se produzca (Fotografía 2.7.3.2).



Fotografía 2.7.3.2. Germinación de la semilla de *C. spinosa*. Detalle de la rotura de la cubierta (a) y de la emergencia de la radícula (b).

Las paredes celulares del endospermo de las semillas de algunas especies están constituidas principalmente por polímeros de manosa y galactomanosa, por lo que diversos estudios se han centrado en la acción de varios enzimas, de entre los que destaca la endo- β -mananasa, cuya actividad se ha correlacionado linealmente con la resistencia decreciente a la penetración (Hilhorst y Karseen, 1992; Koornneef *et al.*, 2002) y con la emergencia de la radícula (Sánchez y de Miguel, 1997). No obstante, la situación es compleja de modo que una elevada actividad de la endo- β -mananasa no asegura la germinación de las semillas (Toorop 1996, Dahal, 1997, Still y Bradford, 1997), siendo probablemente necesaria la acción de otros enzimas. En diversos estudios se ha relacionado la actividad de diversos enzimas con el debilitamiento del endospermo antes de emerger la radícula de las semillas de varias especies: de β -mananasa y β -manosidasa (hemicelulasas) en semillas de *Datura* (Sánchez y de Miguel, 1997), exopoligalacturonasa (glucanasa) en semillas de tomate (Sitrit *et al.*, 1996), y de β -1,3 glucanasa en semillas de tabaco (Leubner-Metzger *et al.*, 1996).

Los efectos positivos de los dos complejos enzimáticos están probablemente relacionados con el debilitamiento de los tejidos que dificultan la expansión del embrión, endospermo y/o cubierta de la semilla,

puesto que como se ha indicado anteriormente, la Driselasa tiene acción celulasa (endoglucanasa, celobiohidrolasa y β -glucosidasa), laminarinasa, xilanasas y pectinasa, y el complejo CTR tiene actividad celulasa (endoglucanasa, celobiohidrolasa y β -glucosidasa).

Tabla 2.7.3.3. Efecto del complejo enzimático (CE), del tiempo de la incubación enzimática (T; h) en el porcentaje de germinación de las semillas (G), en la viabilidad de las semillas no germinadas tras el ensayo de germinación (sng), y la viabilidad total de las semillas tras la incubación (semillas germinadas +semillas viables), en el experimento 1. Valores medios.

CE	T	G (%)	Viabilidad (sng, %)	Viabilidad total (%)
Control	60 h	19.00	95.0	95.95
	120 h	38.00	94.0	96.28
Driselasa	60 h	49.63	85.5	92.70
	120 h	78.00	86.0	96.92
CTR	60 h	91.25	92.5	99.34
	120 h	98.00	92.5	99.85

La viabilidad del lote de semillas, determinada mediante el test del tetrazolio, antes de iniciar el tratamiento enzimático era del 97.5%. En el ensayo de viabilidad realizado tras el ensayo germinación se utilizaron todas las semillas que no habían germinado en cada repetición de cada tratamiento, por lo que el número de semillas utilizado en cada caso fue muy dispar, y por este motivo no se realizó el análisis estadístico, que, por otra parte, a la vista de los resultados, es innecesario. En efecto, en la tabla 2.7.3.3 se presentan los valores medios de la viabilidad de las semillas no germinadas, correspondientes a cada tratamiento, tras el ensayo de germinación, y la viabilidad total correspondiente a cada tratamiento (semillas germinadas +semillas viables). Se observa que ninguno de los dos complejo enzimáticos afectó negativamente a la viabilidad de las semillas, a

pesar de la creencia de que los preparados enzimáticos pueden incluir impurezas, como nucleasas y proteasas, que pueden afectar negativamente a la viabilidad celular (López Encina, 1996), e incluso cabría pensar que la combinación de la incubación con el complejo *Trichoderma reesei* y la adición de AG₃ al sustrato de germinación, podría haber aumentado el potencial germinativo de las semillas, consiguiéndose la germinación del 100% de las semillas. En este sentido, tal y como se ha indicado anteriormente, se ha comprobado que tanto el desarrollo de la actividad endo- β -mananasa como la germinación, dependen estrictamente de la aplicación de giberelinas exógenas en las semillas de tomate mutante deficientes en GAs (Still y Bradford, 1997). Groot *et al.* (1988) demostraron que la aplicación de AG₃, en semillas de tomate, indujo la hidrólisis enzimática de la manosa de las paredes celulares del endospermo.

Por otra parte, la actividad endo- β -mananasa detectada en el endospermo antes de la emergencia de la radícula en semillas de tomate fue inhibida por la aplicación de ABA, bloqueando la emergencia de la radícula (Welbaum *et al.*, 1998), por lo que es probable que en el presente estudio, el tratamiento enzimático haya mejorado la germinación debido al debilitamiento de los tejidos que restringían el crecimiento de la radícula (Delgado-Sánchez *et al.*, 2010; 2011), pero también es posible que, al menos en parte, se deba a la lixiviación de ABA, dado que Yambe y Takeno (1992) constataron la lixiviación de ABA con la incubación enzimática de aquenios de rosa.

2.7.3.3.2. Experimento 2. Efecto de distintas concentraciones del complejo de *Trichoderma reesei*

Al evaluar el efecto de distintas concentraciones del CTR, los coeficientes de determinación (R^2) obtenidos en las 80 curvas fueron superiores a 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 2.7.3.15, 2.7.3.16 y 2.7.3.17 se muestran las curvas ajustadas correspondientes a los valores medios de los tres factores analizados para las distintas concentraciones del CTR. La incubación con el complejo enzimático (Figura 2.7.3.15), y la adición de AG₃ al sustrato (Figura 2.7.3.17) incrementaron y adelantaron la germinación con respecto al control, disminuyendo el valor de t_{50} al aumentar la concentración y la duración de la incubación.

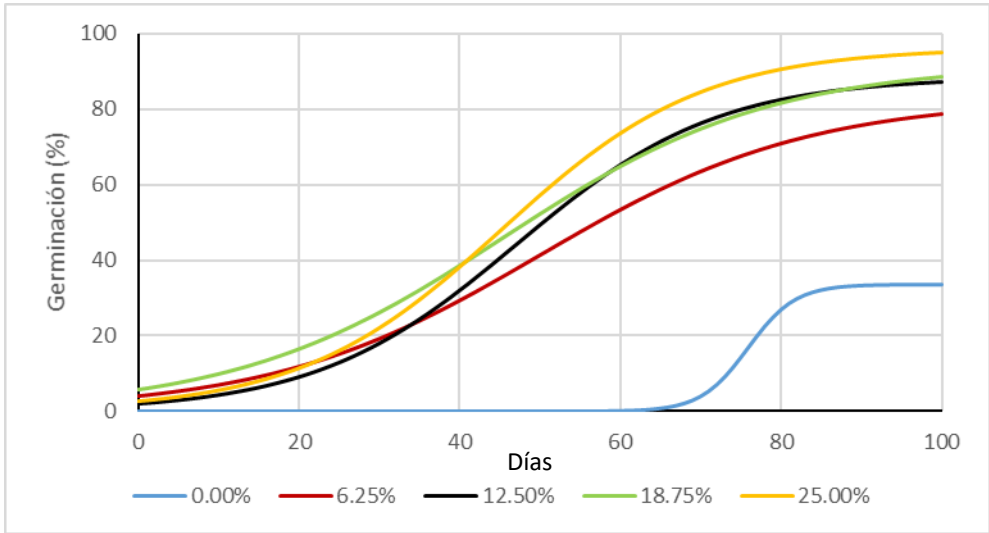


Figura 27.3.15. Modelo logístico ajustado a la germinación acumulada correspondiente a los valores medios de las concentraciones del complejo enzimático *Trichoderma reesei*, del experimento 2.

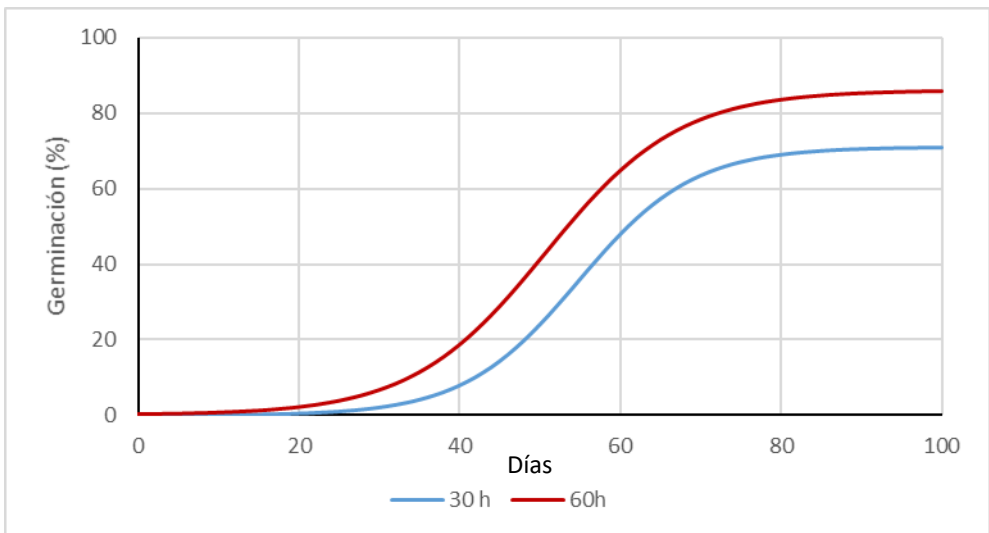


Figura 27.3.16. Modelo logístico ajustado a la germinación acumulada correspondiente a los valores medios de los tiempos de incubación con el complejo enzimático *Trichoderma reesei*, del experimento 2.

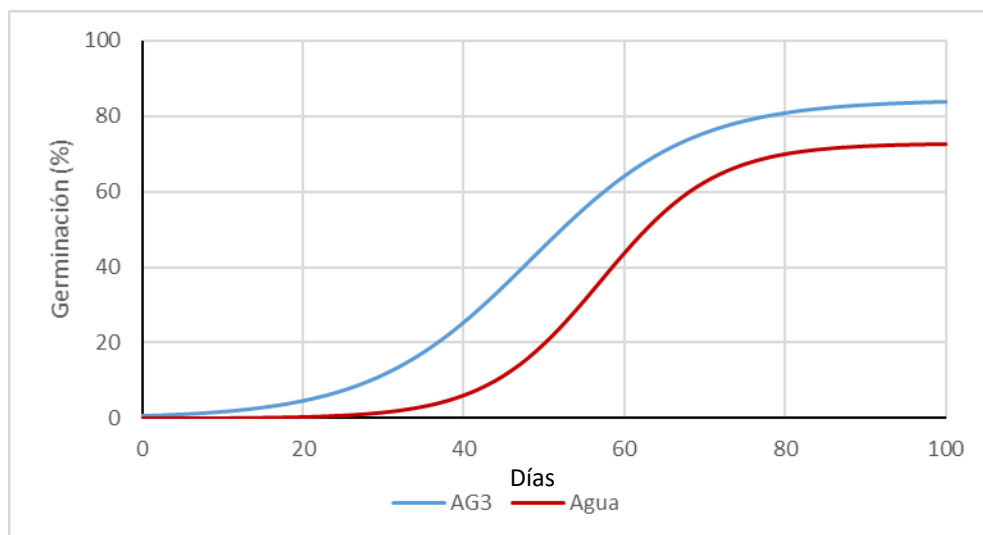


Figura 2.7.3.17. Modelo logístico ajustado a la germinación acumulada correspondiente a los valores medios de la adición de ácido giberélico (AG₃), del experimento 2.

Todos los parámetros evaluados fueron afectados significativamente ($P \leq 0.01$) por todos los factores considerados, concentración del CTR, tiempo de incubación, y adición de AG₃ al sustrato, así como por sus respectivas interacciones (Tabla 2.7.3.4). El factor que más influyó en la germinación acumulada (G) fue la concentración del CTR, representando el 69% de la variabilidad de G, seguido de la interacción “Complejo enzimático x Tiempo de incubación”, que representó el 12% (Tabla 2.7.3.4). Al igual que en el experimento 1, en las figuras 2.7.3.18, 2.7.3.19 y 2.7.3.20 se presentan los valores correspondientes a las tres interacciones de la tabla 2.7.3.4, cuyos valores se presentan en la tabla 2.7.3.5.

Tabla 2.7.3.4. Efecto de la concentración del complejo enzimático de *Trichoderma reesei* (C, %), del tiempo de incubación (T, horas) y de la adición de AG3 al sustrato (AG3), en la germinación acumulada (G, %), máximo porcentaje de germinación (A, %), número de días necesarios para alcanzar el 50% de la germinación final ($t_{50} = \beta/k$, días) y velocidad media relativa de germinación acumulada ($k/2$, d-1), del experimento 2.

		G		A		t_{50}		$k/2$	
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)	30 h	70.18	b	71.16	b	54.77	a	0.07	a
	60 h	85.10	a	85.98	a	50.72	b	0.06	b
AG ₃	AG ₃	83.68	a	84.35	a	48.42	b	0.05	b
	Agua	71.60	b	72.79	b	57.07	a	0.07	a

Análisis de la Varianza

Factores (grados de libertad)	%Suma de Cuadrados							
C (4)	69.01	**	70.61	**	77.36	**	74.62	**
T (1)	5.09	**	4.49	**	10.59	**	3.70	**
AG ₃ (1)	7.78	**	7.38	**	2.32	**	0.64	**
C x T (4)	11.64	**	11.46	**	0.28	**	0.65	**
C x AG ₃ (4)	3.16	**	2.63	**	8.07	**	18.11	**
T x AG ₃ (1)	0.39	**	0.48	**	0.36	**	0.58	**
Residual (64)	2.92		2.95		1.02		1.69	
Desviación estándar (+)	5.108		5.240		1.500		0.009	

Letras distintas en una misma columna indican diferencias ($p \leq 0.05$) según el test LSD. ** nivel de significación $P \leq 0.01$. (+) La desviación estándar se ha calculado como la raíz cuadrada del cuadrado medio residual.

Al analizar la interacción “Concentración del complejo enzimático x Tiempo de incubación” (Tabla 2.7.3.5, Figura 2.7.3.16) se observa que, por una parte, el tratamiento con complejo enzimático aumentó ($P \leq 0.05$) los valores de G y A, disminuyendo los valores de t_{50} y $k/2$, y que al aumentar la concentración del complejo enzimático aumentaron los valores de G y A, y disminuyeron los valores de t_{50} y $k/2$.

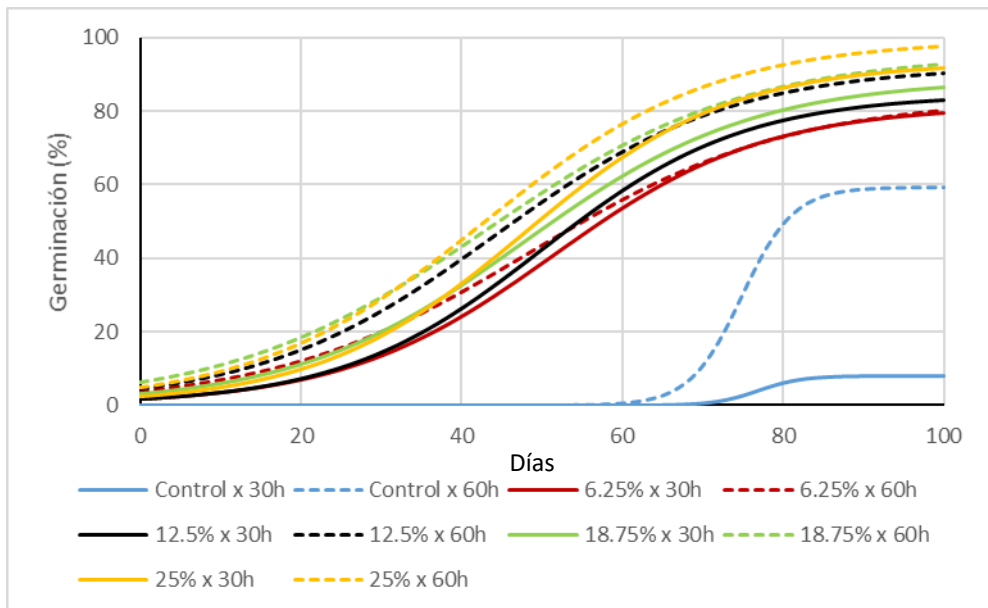


Figura 2.7.3.18. Modelo logístico ajustado a la germinación acumulada correspondiente a los valores medios de la interacción “Concentración complejo enzimático x Tiempo de incubación”, del experimento 2.

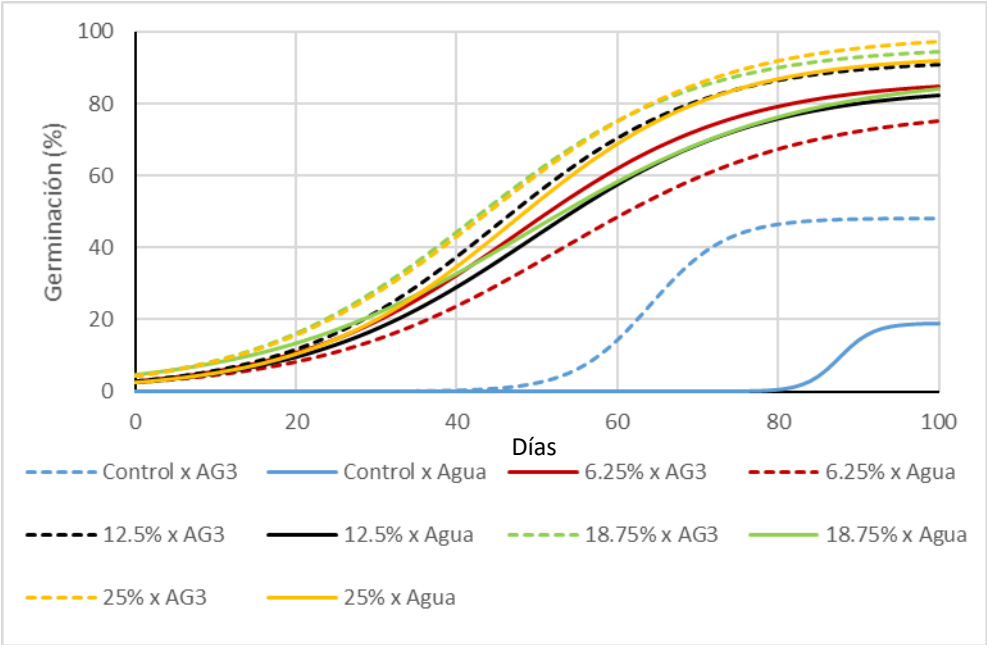


Figura 2.7.3.19. Modelo logístico ajustado a la germinación acumulada correspondiente a los valores medios de la interacción “Complejo enzimático x Adición de AG₃ al sustrato”, del experimento 2.

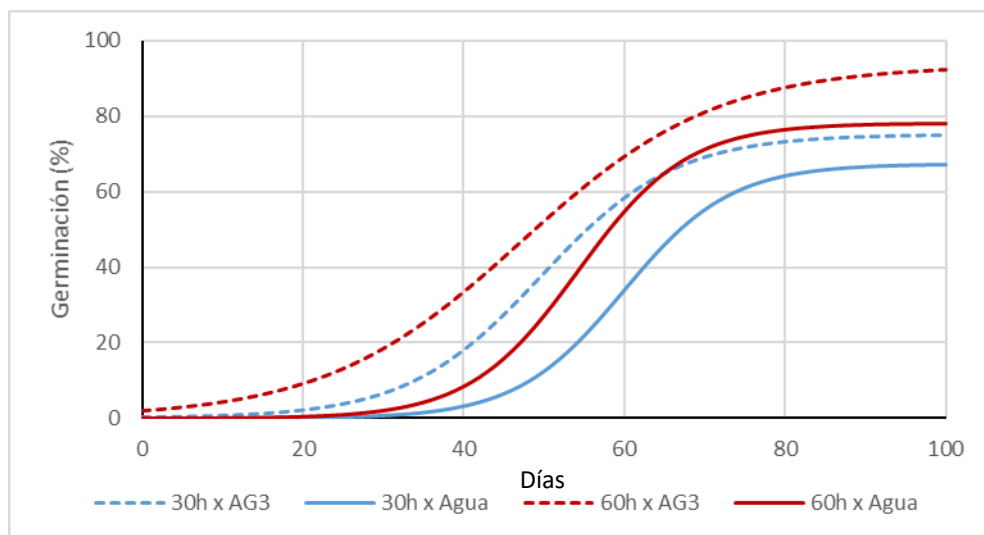


Figura 2.7.3.20 Modelo logístico ajustado a la germinación acumulada correspondiente a los valores medios de la interacción “Tiempo de incubación x Adición de AG₃ al sustrato”, del experimento 2.

Todas las diferencias entre los valores de G (y de A) correspondientes a los dos tiempos de incubación, resultaron significativas ($P \leq 0.05$), a excepción de la concentración de 6.25% (Tabla 2.7.3.5; Figura 2.7.3.18); la mayor diferencia entre estos dos valores se obtuvo con el tratamiento control, es decir cuando no actuó el complejo enzimático, y por tanto, cuando la incubación realmente fue un remojo con agitación.

Tabla 2.7.3.5. Análisis de las interacciones significativas de los análisis de la varianza de la tabla 2.7.3.4. Concentración del complejo enzimático de *Trichoderma reesei* (C, %), tiempo de la incubación (T, h), adición de AG₃ al sustrato (AG₃), germinación acumulada (G; %), máximo porcentaje de germinación (A; %), número de días necesarios para alcanzar el 50% de la germinación final (t_{50} ; β/k , d) y velocidad media relativa de germinación acumulada ($k/2$; d^{-1}) del experimento 2.

		G	A	t_{50}	$k/2$
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 AG ₃	50.00	48.18	64.11	0.105
	Control x Agua	19.00	19.03	87.67	0.235
	6.25% x AG ₃	83.50	86.66	47.26	0.036
	6.25% x Agua	75.50	78.55	52.80	0.033
	12.5% x AG ₃	91.25	92.13	44.93	0.039
	12.5% x Agua	83.25	84.61	49.26	0.035
	18.75% x AG ₃	95.13	95.77	42.06	0.036
	18.75% x Agua	87.13	88.20	48.83	0.030
	25% x AG ₃	98.50	99.03	43.73	0.035
	25% x Agua	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 AG ₃	74.55	75.05	49.65	0.060
	30h x Agua	65.80	67.27	59.89	0.075
	60h x AG ₃	92.80	93.65	47.18	0.041
	60h x Agua	77.40	78.32	54.25	0.074
	LSD ($p \leq 0.05$)	3.23	3.31	0.95	0.006

Las diferencias entre los valores de t_{50} correspondientes a los dos tiempos de incubación resultaron significativas ($P \leq 0.05$) en todos los casos, resultando mayores en las concentraciones elevadas (12.5, 18.5 y 25%) que en el tratamiento control y en la concentración más baja (6.25%), mientras que las únicas diferencias significativas ($P \leq 0.05$) entre los valores de $k/2$ correspondieron al control.

La germinación obtenida con la solución menos concentrada (6.25%) fue superior a las obtenidas en el primer experimento con Driselasa, mientras que con las mayores concentraciones, con menor tiempo de aplicación, se alcanzaron germinaciones similares a las allí obtenidas con CTR, por lo que como ya se ha comentado anteriormente, superan a las germinaciones obtenidas en estudios anteriores (Orphanos, 1983; Macchia y Casano, 1993; Sozzi y Chiesa, 1995; Yildirim, 1998; Tansi 1999; Rinaldelli, 2000; Yildirim y Bayran, 2001; Pascual *et al.*, 2004, 2006 y 2009; Khaninejad *et al.*, 2012), aunque evidentemente es necesario remarcar que la germinación final depende de la viabilidad inicial de las semillas de cada lote.

En cuanto a la viabilidad de las semillas (Tabla 2.7.3.6), los resultados son idénticos a los obtenidos en el experimento 1, de manera que con el complejo CTR se alcanzó el 100% de germinación, lo que podría deberse a que el tratamiento enzimático debilitara los tejidos que restringían el crecimiento de la radícula (endospermo y cubiertas) y simultáneamente acelerara la lixiviación de ABA, con una lixiviación de ABA similar a la constatada por Yambe y Takeno (1992) en aquenios de rosa. Además, tal y como se ha citado anteriormente, la combinación de la incubación con el complejo CTR y la adición de AG_3 al sustrato de germinación, podría haber aumentado el potencial germinativo de las semillas, consiguiéndose que germinaran algunas semillas que, por su bajo vigor, se consideraron inicialmente como no viables.

Tabla 2.7.3.6. Efecto del tiempo de la incubación enzimática (T) y de la concentración del complejo enzimático (*Trichoderma reesei*) en el porcentaje de germinación de las semillas (G), en la viabilidad de las semillas no germinadas tras el ensayo de germinación (sng), y la viabilidad total de las semillas tras la incubación (semillas germinadas +semillas viables), en el experimento 2. Valores medios.

T	Concentración (%)	G (%)	Viabilidad (sng, %)	Viabilidad Total (%)
30 h	0.00	9.0	94.00	94.5
	6.25	79.25	96.00	99.2
	12.50	83.25	92.75	98.8
	18.75	87.25	93.50	99.2
	25.00	92.13	100.0	100.0
60 h	0.00	60.00	76.50	90.6
	6.25	79.75	87.50	97.5
	12.50	91.25	92.50	98.9
	18.75	95.00	100.00	100.0
	25.00	99.50	100.00	100.0

De los análisis de las semillas realizados tras la incubación (Tabla 2.7.3.7), se deduce que el complejo enzimático CTR disminuyó la concentración en celulosa, hemicelulosa y lignina de las semillas, y este efecto se incrementó tanto al incrementar la concentración del complejo como al incrementar el tiempo incubación. Con la incubación de 30 (60) horas, la disminución llegó a alcanzar valores del 25% (26%) en el contenido en celulosa, 50% (38%), en hemicelulosa, y 23% (25%) en lignina. Con el aumento del tiempo de la incubación (de 30 a 60 h) también disminuyeron estos contenidos, de 13.1 a 10.6% en el contenido en celulosa, de 5.0 a 4.2% en hemicelulosa, y de 24.2 a 19.6% en lignina, en el caso de la concentración de 25% (Tabla 2.7.3.7). Es de remarcar que esta disminución del contenido al aumentar el tiempo de incubación, también se produjo con el tratamiento control, por lo que cabe concluir que el remojo,

con agua y con agitación, también produce la degradación de la celulosa, hemicelulosa y lignina.

La disminución del contenido en celulosa coincide con lo reportado por Park *et al.* (2001), que obtuvieron rendimientos hidrolíticos del orden del 40% de la celulosa de los residuos de papel de oficina.

Tabla 2.7.3.7. Efecto de la concentración del complejo enzimático *Trichoderma reesei* y del tiempo de incubación en el contenido en celulosa, hemicelulosa y lignina de las semillas, tras la incubación.

Tiempo	Concentración (%)	Celulosa (% ms)	Hemicelulosa (% ms)	Lignina (% ms)
30 h	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 h	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

El contenido en sólidos solubles de la solución del complejo enzimático al finalizar la incubación aumentó con la concentración del complejo y con el tiempo de incubación (Tabla 2.7.3.8, Figura 2.7.3.21), lo que significa una mayor hidrólisis de la celulosa, hemicelulosa y lignina. En el transcurso de la incubación, y paralelamente al incremento del contenido en sólidos solubles, se constató un cambio en la coloración de la solución, que tomaba una coloración parda, y que queda reflejado en el aumento de los valores de las coordenadas Hunter (L,a,b) a (pasando de valores

negativos a positivos) y b, la disminución del valor de L, y el incremento del parámetro Cromo (Tabla 2.7.3.8, Figura 2.7.3.22). Esta evolución de los valores citados se produce tanto al aumentar la concentración del complejo CTR, como del tiempo de incubación. Las figuras 2.7.3.21 y 2.7.3.228 han sido incluidas al considerarse que facilitan la interpretación de la tabla 2.7.3.8.

Tabla 2.7.3.8. Efecto de la concentración del complejo enzimático *Trichoderma reesei* y del tiempo de incubación en el contenido en sólidos solubles totales (SST), coordenadas Hunter a, b, L, y valor de Cromo, correspondientes a cada solución del complejo enzimático al finalizar incubación.

Concentración	Tiempo	SST (°Brix)	a	b	L	Crom
0.00	0	0.00	-0.22	-0.51	90.5	0.56
	30	0.00	-0.13	2.04	48.0	1.56
	60	0.00	0.27	1.54	44.8	2.04
6.25	0	0.00	-0.02	-0.60	50.5	0.60
	30	4.23	-0.39	8.19	42.1	6.59
	60	4.70	0.95	6.52	31.5	8.20
12.50	0	0.00	-0.09	3.07	44.6	3.10
	30	7.53	-0.06	8.07	35.6	7.47
	60	8.00	0.98	7.41	27.6	8.07
18.75	0	0.00	-0.17	5.66	40.9	5.66
	30	9.68	0.16	8.06	35.9	8.06
	60	10.30	0.18	9.39	10.3	9.39
25.00	0	0.10	-0.11	5.88	40.5	5.88
	30	14.50	0.54	11.3	34.0	11.40
	60	15.30	1.27	11.3	32.5	11.46

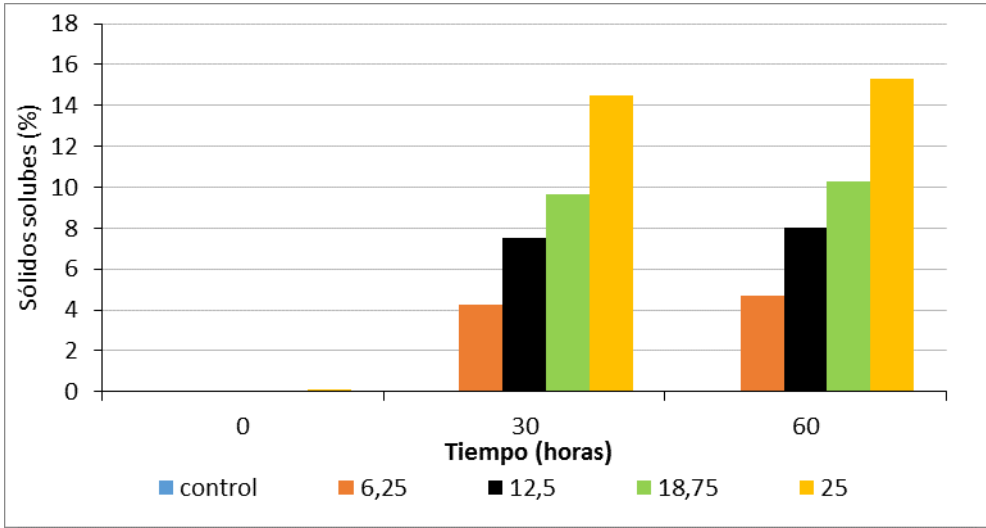


Figura 2.7.3.21. Contenido de sólidos solubles totales de la solución del complejo *Trichoderma reesei* al finalizar la incubación para cada una de las concentraciones de complejo ensayadas (0, 6.25, 12.5, 18.75 y 25%).

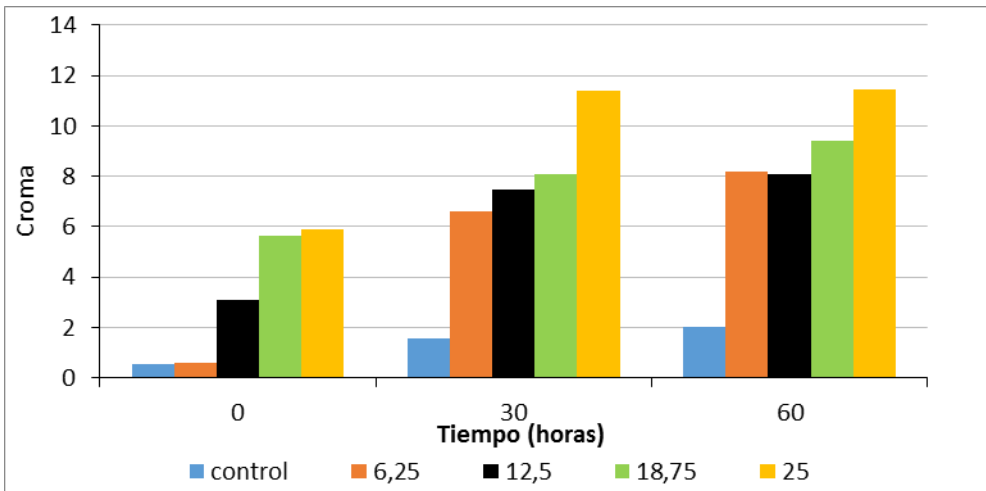


Figura 2.7.3.22. Valor de Croma de las distintas soluciones del complejo *Trichoderma reesei* al finalizar la incubación para cada una de las concentraciones de complejo ensayadas (0, 6.25, 12.5, 18.75 y 25%).

2.7.3.4. Conclusiones

La incubación de las semillas con el complejo Cellulase from *Trichoderma reesei* provoca una disminución del contenido en celulosa, hemicelulosa y lignina de las semillas de *Capparis spinosa* L. subsp. *rupestris*, y la consiguiente presencia de sólidos solubles en la solución del complejo enzimático, es decir que consigue la escarificación de las semillas.

La escarificación enzimática es un método adecuado para mejorar la germinación de las semillas de *Capparis spinosa* L. subsp. *rupestris*. Con el complejo Cellulase from *Trichoderma reesei* puede conseguirse disminuir la resistencia que la cubierta y el endospermo ofrecen a la protrusión de la radícula, sin dañar el embrión, de manera que, con las concentraciones más elevadas ensayadas, se obtienen porcentajes de germinación muy elevados.

A pesar de que los porcentajes de germinación obtenidos tras la incubación de las semillas con el complejo Cellulase from *Trichoderma reesei* son muy elevados, la adición de AG₃ al sustrato de germinación consigue aumentarlos, obteniéndose en la mayor concentración ensayada, la germinación de todas las semillas viables.

El porcentaje de germinación conseguido depende de la concentración del complejo enzimático y de la duración del tratamiento.

Con la incubación con el complejo Driselasa se consigue una mejora en la germinación, sin llegar a alcanzar los niveles obtenidos con el complejo Cellulase from *Trichoderma reesei*.

2.8. EFECTO DE LA ESTRATIFICACIÓN EN LA GERMINACIÓN DE LAS SEMILLAS DE *CAPPARIS SPINOSA* L. SUBSP. *RUPESTRIS*

2.8.1. Introducción

La latencia embrionaria de las semillas puede deberse a inhibición fisiológica o a inmadurez morfológica. En el primer caso, la semilla, con embrión completamente desarrollado, es incapaz de germinar al ser puesta en condiciones ambientales adecuadas para la germinación. En los mecanismos de regulación de este tipo de latencia de las semillas interviene la concentración de diversas fitohormonas, que son hormonas de origen natural, endógenas en las plantas (Desai 2004). El control hormonal de la latencia depende de la acción antagonista entre los distintos tipos de fitohormonas, por una parte, el grupo de las hormonas estimulantes del crecimiento, que incluye giberelinas (GAs) y citoquininas (CKs), y por otra parte el grupo de los inhibidores del crecimiento, el ácido abscísico (ABA). Además, en la germinación de las semillas también intervienen otras hormonas, como auxinas y etileno (Bewley y Black 1994). Estudios recientes indican la importancia en el control de la germinación de jasmonatos (Linkies y Leubner-Metzger 2012), brasinoesteroides (Hartmann *et al.*, 2014) y butenolides (Hartmann *et al.*, 2014). Los factores que producen la inhibición fisiológica pueden estar localizados en el eje embrionario y/o en los cotiledones, transfiriéndose desde allí al resto del embrión (Taiz 2010). El incremento del nivel endógeno de ABA que se produce al final de la embriogénesis está relacionado con la iniciación del proceso de maduración de las semillas y con el mecanismo de la latencia de las mismas (Zacarías y Lafuente 2013).

En la latencia de las semillas debida a inmadurez morfológica, el embrión no ha completado su crecimiento y desarrollo cuando la semilla ha sido recolectada, lo que puede producirse al conservarse la semilla en ambiente húmedo y a temperaturas relativamente elevadas, lo que se conoce como estratificación cálida.

La estratificación es un tratamiento en el que las semillas embebidas de agua son sometidas a diferentes temperaturas durante cierto tiempo para que se realice la postmaduración del embrión (Hartmann *et al.*, 2014). La utilización de este término se debe probablemente a que, desde antiguo, en Europa los viveristas solían colocar las semillas en capas intercaladas con un sustrato (como la arena), al aire libre durante el invierno. Así lo detallaba en 1664 J. Evelyn en “*a discourse of forest trees and the propagation of timber*”, y en 1679 M. Cook en “*The manner of raising, ordering and improving forest and fruit trees*” (Gosling, 2006).

En la actualidad, en la estratificación refrigerada, las semillas húmedas se colocan en sustrato húmedo, en condiciones controladas, a una temperatura de 0 a 10°C, durante un periodo variable según la especie, entre 1 y 4 meses, con el objetivo de superar la latencia por inhibición fisiológica. En la estratificación cálida, en lugar de someter las semillas a bajas temperaturas, se someten a temperaturas cálidas, y su objetivo puede ser doble, que se produzca la maduración de los embriones con inmadurez morfológica y/o que se reblandezcan las cubiertas debido a la actividad de los microorganismos (Pascual *et al.*, 2017). Las semillas húmedas pueden estratificarse en un sustrato húmedo (por ejemplo, a base de arena, turba rubia, vermiculita) o sin sustrato, en bolsas de plástico (denominada estratificación desnuda).

El contenido de humedad de la semilla para responder al proceso de enfriamiento varía con la especie; no obstante, existe una regla general que parece indicar que la respuesta más rápida se produce a contenidos de humedad un poco por debajo de la imbibición total (Gosling, 2006).

La duración del periodo de refrigeración varía mucho entre especies; así, por ejemplo, mientras las semillas de unas especies (como *Fagus*, *Quercus*, *Pinus* o *Abies*) pueden necesitar únicamente unos días o semanas, otras (como el acebo y el tejo) pueden requerir varios meses o años (Gosling, 2006). Además, las condiciones ambientales en las que se han producido y madurado las semillas, el momento de la recolección, la forma en que se han sido procesadas y almacenadas, también influyen en el grado

de latencia, y por tanto en el requerimiento de estratificación. Para la mayoría de las especies es suficiente de 1 a 4 meses; durante este tiempo las semillas deben ser examinadas periódicamente para evitar que se desequen, rehumedeciendo, si es necesario, el sustrato, (Hartmann *et al.*, 2014).

La temperatura habitual de estratificación refrigerada es de 1 a 10°C. A mayores temperaturas las semillas pueden germinar prematuramente, y por encima de 15°C no suele superarse la latencia, mientras que a menor temperatura (justo por encima de la congelación) se puede retrasar la germinación (Hartmann, *et al.*, 2014). La estratificación cálida se realiza habitualmente a temperaturas superiores a 25°C, y puede ser muy alta (de 30 a 35°C) en algunas especies tropicales (como la palmera).

El objetivo de este estudio es analizar el efecto de la estratificación, refrigerada y cálida, en la germinación de las semillas. Paralelamente a la estratificación refrigerada se estudió la evolución de la concentración de GAs, CKs y ABA, durante la estratificación, para intentar relacionar ambos procesos.

2.8.2 Efecto de la estratificación refrigerada en la germinación de las semillas de *C. spinosa* L. subsp. *rupestris*

2.8.2.1. Material y métodos

En este estudio, realizado durante el verano de 2016, se establecieron cuatro periodos de estratificación, 0, 30, 60 y 90 d, combinando, o no, la estratificación con un tratamiento de remojo previo durante 48 h. Del lote de semillas recolectadas en la primera semana de octubre de 2014 (procesadas según se indica en 2.2.1) se formaron 8 grupos de semillas, de 8 g cada uno (con no menos de 900 semillas por grupo).

Las semillas a estratificar (6 grupos), tras ser desinfectadas, se colocaron entre dos mallas microperforadas, inmersas en turba *sphagnum*

humedecida, en el interior de unas bandejas de plástico de 30 x 20 cm. Las mallas se utilizaron para facilitar la extracción de las semillas para la realización del ensayo de germinación. Las bandejas se introdujeron en bolsas de polietileno, herméticamente cerradas para evitar la pérdida de humedad y, a su vez, se introdujeron en cámara refrigerada (Climatronic) a la temperatura de 4°C, durante el tiempo pertinente.

Las semillas correspondientes al tratamiento de remojo, previo a la estratificación, se mantuvieron durante 48 h a remojo en agua destilada, en vasos de precipitado de 50 mL de capacidad. Transcurridas las 48 h, las semillas se sacaron y se realizó el mismo procedimiento descrito en el párrafo anterior.

Antes y después de realizar la estratificación refrigerada (antes de realizar el ensayo de germinación), se determinó la viabilidad de las semillas de cada grupo, mediante la realización del ensayo al tetrazolio, tal y como se ha descrito en el apartado 2.2.2.

Con las semillas estratificadas (y también con las semillas control) se realizó el ensayo de germinación, tal y como se ha descrito en el apartado 2.2.3. Una vez finalizado este ensayo, se determinó la viabilidad de las semillas que no habían germinado, mediante la realización del ensayo al tetrazolio.

Para estudiar la evolución del contenido hormonal de las semillas durante la estratificación se utilizaron otras 6 bandejas de plástico, de 10 x 7 cm, en el interior de cada una de las cuales, inmersas en turba humedecida, se depositó 1g de semillas entre dos mallas microperforadas, tal y como se ha descrito anteriormente. Tras diferentes pruebas para conseguir un triturado homogéneo de las semillas, se constató que el método más adecuado para preparar las semillas para el análisis hormonal, era congelar las semillas a -80°C, liofilizarlas y triturarlas manualmente en un mortero. Cada 15 días se extrajo una bandeja de la cámara frigorífica, las semillas se limpiaron y pesaron, tras lo cual se congelaron. Transcurridas las 12 semanas (84 d) de estratificación, las muestras congeladas se liofilizaron (incluidas las semillas control) en un liofilizador VirTis BenchTop 2K, SP 280

SCIENTIFIC. Tras ser liofilizadas, las semillas fueron pesadas de nuevo para la determinación de la pérdida de humedad. Tras triturar las semillas, se introdujeron 100 mg (aproximadamente) de la muestra en microtubos tipo *Eppendorf* de 2 mL, de fondo redondo. De cada muestra, se enviaron tres repeticiones al Servicio de Cuantificación de Hormonas Vegetales del Instituto de Biología Molecular y Celular de Plantas (UPV-CSIC). Las hormonas cuantificadas fueron: GAs activas (GA₁+GA₄), ácido abscísico (ABA), ácido indol-3-acético (IAA) y 3 CKs: dihidrozeatina (DHZ), isopenteniladenina (iP) y t-zeatina (tZ).

2.8.2.2. Resultados y discusión

2.8.2.2.1. Viabilidad y germinación de las semillas

La viabilidad inicial de las semillas utilizadas en este ensayo (considerando viables las semillas con tejidos clasificadas como tipo A; Tabla 2.8.2.1) presentó un valor aceptable (84%), inferior a la obtenida (97.5%) por Fernández-Antoine (2014) un año antes (en 2015), utilizando semillas del mismo lote, y a la obtenida (93 %) por (Sozzi y Chiesa, 1995) con un lote de semillas producidas en Argentina por plantas de una población española. La pérdida de viabilidad (13.5%) es superior a la que cabría esperar de la utilización de la función “Pérdida de viabilidad” presentada en el estudio del “Análisis de la longevidad de las semillas” (apartado 2.6.2) de esta tesis doctoral (7.6%). Este valor más bajo de la viabilidad podría estar relacionado con un menor vigor de las semillas, que a su vez podría conducir a un poder germinativo inferior al esperado.

La estratificación refrigerada de las semillas redujo la viabilidad ($P \leq 0.01$), disminuyendo su valor inicial (84%) al aumentar la duración de la estratificación, de manera significativa hasta los 60 días (39%; $P \leq 0.05$; Tabla 2.8.2.1). Este resultado que parece sorprendente, no coincide con los

resultados obtenidos por (Sozzi y Chiesa, 1995) quienes no observaron una disminución de la viabilidad inicial (93%). El remojo previo a la estratificación resultó positivo, aumentando ($P \leq 0,01$) la viabilidad de las semillas (en promedio de 47 a 56%; Tabla 2.8.2.1). La interacción “Periodo de estratificación x Remojo previo”, no resultó significativa ($P \leq 0.01$).

Tabla 2.8.2.1. Viabilidad de las semillas después de la estratificación refrigerada y del remojo previo, expresada en porcentaje de semillas con tejidos tipo: (A) tejidos sanos, (B) tejidos débiles y viables, (C) tejidos teñidos no viables y (D) tejidos no teñidos, muertos.

	A (%)	B (%)	C (%)	D (%)
Periodo estratificación (PE)				
0 d	83.75 a	10.00 c	6.25 b	0.00 b
30 d	50.00 b	27.50 b	15.00 a	7.50 a
60 d	38.75 c	36.25 a	15.00 a	10.00 a
90 d	33.75 c	37.50 a	17.50 a	11.25 a
Remojo previo (RP)				
0 h	46.88 b	29.38	15.63 a	8.13
48 h	56.25 a	26.25	11.25 b	6.25
Análisis de la Varianza				
Factores (grados de libertad)	% Suma de cuadrados			
PE (3)	83.16 **	72.18 **	38.40 **	42.11 **
RP (1)	4.81 **	1.46 NS	10.06 *	1.94 NS
PE x RP (3)	2.97 NS	2.51 NS	10.47 NS	2.37 NS
Residual (24)	9.06	23.85	41.07	53.56
Desviación estándar (+)	7.43	7.29	5.10	5.68

Letras distintas en una misma columna indican diferencias significativas con ($p \leq 0.05$) según el test LSD. NS No significativo, * Nivel de significación ($p \leq 0.05$). ** Nivel de significación ($p \leq 0.01$). (+) La desviación estándar se ha calculado como la raíz cuadrada del cuadrado medio residual.

La germinación de las semillas estratificadas durante 30, 60 y 90 días mejoró ($P \leq 0.01$; Tabla 2.8.2.2) con respecto a las semillas control. La

mayor germinación acumulada se obtuvo con las estratificaciones de 60 y 90 días (23% en ambos casos). Estos resultados mejoran a los obtenidos por Imbernón (2000), que realizó la estratificación durante únicamente 7 días. El remojo previo a la estratificación y la adición de AG₃ al sustrato incrementaron ($P \leq 0.01$) la germinación acumulada (de 17 a 22% y de 15 a 23%, respectivamente; Tabla 2.8.2.2). Aunque positivos, estos resultados no alcanzan a los obtenidos por Olmez *et al.* (2004; 2006) con semillas de *C. ovata*, quienes obtuvieron con estratificaciones de 60 días, incrementos de germinación de 10 a 65% y de 4 a 47% con semillas producidas respectivamente en 1998 y 2002, en Turquía. El tiempo para alcanzar el 50% de la germinación acumulada solo disminuyó significativamente ($P \leq 0.05$) en la estratificación de 90 días (Tabla 2.8.2.2). La adición de AG mejoró ($P \leq 0.01$) la germinación acumulada y redujo el t_{50} ($p \leq 0.01$) en casi un mes (de 68 a 39 días; Tabla 2.8.2.2), como resulta habitual en los ensayos de germinación de estas semillas, tal y como se ha obtenido en los diferentes apartados de esta tesis doctoral.

A continuación se analizan las interacciones que resultaron significativas; del análisis de la interacción entre el periodo de estratificación y el remojo previo (Tabla 2.8.2.3; Figura 2.8.2.1) se concluye que tanto en el control como en la estratificación de 60 días, el remojo previo no mejoró significativamente ($P \leq 0.05$) la germinación, lo que sí que ocurrió con los tratamientos de 30 y 90 días, y también aumentó la velocidad relativa de germinación ($k/2$) en la estratificación de 30 días ($P \leq 0.05$; se observa el cambio de pendiente con el remojo previo). Resulta evidente que, a mayor periodo de estratificación, combinado con el remojo previo, mayor fue el porcentaje de germinación obtenida (Tabla 2.8.2.3; Figura 2.8.2.1). Estos resultados coinciden con lo indicado por Gosling (2006) en el sentido de que parece que la respuesta más rápida a la estratificación refrigerada se produce a contenidos de humedad un poco por debajo de la imbibición total.

Tabla 2.8.2.2. Influencia de la estratificación, el remojo previo y la adición de AG₃ al sustrato en el ensayo de germinación, en la germinación acumulada (G), máximo porcentaje de germinación (A), número de días necesarios para alcanzar el 50 % de la germinación final (t₅₀) y velocidad media relativa de germinación acumulada (k/2).

	G (%)	A (%)	t ₅₀ (d)	k/2 (d ⁻¹)
Periodo estratificación (PE)				
0 d	13.81 c	14.53 d	60.50 a	0.056
30 d	16.63 b	17.28 c	61.09 a	0.063
60 d	23.44 a	25.31 a	54.48 a	0.032
90 d	22.69 a	23.03 b	38.34 b	0.039
Remojo previo (RP)				
0 h	16.66 b	18.04 b	54.69	0.037 b
48 h	21.63 a	22.04 a	52.51	0.058 a
AG ₃				
Agua	14.97 b	16.77 b	67.71 a	0.043
AG ₃	23.31 a	23.31 a	39.49 b	0.051

Análisis de la Varianza

Factores (grados de libertad)	% Suma de cuadrados				
PE (3)	27.93 **	34.38 **	16.58 **	8.00	NS
RP (1)	10.48 **	7.36 **	0.24 NS	5.99	*
AG ₃ (1)	29.56 **	19.64 **	39.17 **	0.73	NS
PE x RP (3)	6.71 **	5.01 **	2.96 NS	13.37	**
PE x AG ₃ (3)	6.56 **	5.23 **	6.35 *	14.96	**
RP x AG ₃ (1)	7.34 **	12.02 **	0.08 NS	4.66	*
PE x RP x AG ₃ (3)	1.47 NS	2.70 *	5.05 NS	5.14	NS
Residual (48)	9.96	13.66	29.58	47.15	
Desviación estándar (+)	2,80	3.15	14.16	0.035	

Letras distintas en una misma columna indican diferencias significativas con ($p \leq 0,05$) según el test LSD. NS No significativo. * Nivel de significación ($p \leq 0,05$). ** Nivel de significación ($p \leq 0,01$). (+) La desviación estándar se ha calculado como la raíz cuadrada del cuadrado medio residual.

Tabla 2.8.2.3. Análisis de las interacciones significativas de los análisis de la varianza de la tabla 2.8.2.2. en la germinación acumulada (G), máximo porcentaje de germinación (A), número de días necesarios para alcanzar el 50 % de la germinación final (t_{50}) y velocidad media relativa de germinación acumulada ($k/2$). PE: Periodo de estratificación (d). RP: Remojo previo (h). AG₃: Adición de AG₃ al sustrato.

		G (%)	A (%)	t_{50} (d)	$k/2$ (d ⁻¹)
PE x RP					
	0 d x 0 h	13.88	13.94	55.55	0.066
	0 d x 48 h	13.75	15.11	65.44	0.046
	30 d x 0 h	11.88	13.52	61.43	0.028
	30 d x 48 h	21.38	21.05	60.75	0.098
	60 d x 0 h	22.25	25.18	58.68	0.022
	60 d x 48 h	24.63	25.45	50.27	0.043
	90 d x 0 h	18.63	19.52	43.11	0.032
	90 d x 48 h	26.75	26.55	33.57	0.046
	LSD ($p \leq 0.05$)	2.81	3.16	14.24	0.035
PE x AG₃					
	0 d x Agua	11.63	13.59	80.01	0.031
	0 d x AG ₃	16.00	15.46	40.98	0.081
	30 d x Agua	12.00	13.17	76.62	0.035
	30 d x AG ₃	21.25	21.40	45.57	0.041
	60 d x Agua	16.25	19.87	71.30	0.031
	60 d x AG ₃	30.63	30.76	37.66	0.033
	90 d x Agua	20.00	20.45	42.94	0.028
	90 d x AG ₃	25.38	25.61	33.75	0.050
	LSD ($p \leq 0.05$)	2.81	3.16	14.24	0.035
RP x AG₃					
	0 h x Agua	14.56	17.33	69.43	0.024
	0 h x AG ₃	18.75	18.75	39.96	0.050
	48h x Agua	15.38	16.21	66.00	0.064
	48 h x 500 AG ₃	27.88	27.87	39.02	0.053
	LSD ($p \leq 0.05$)	1.99	2.24	10.07	0.025

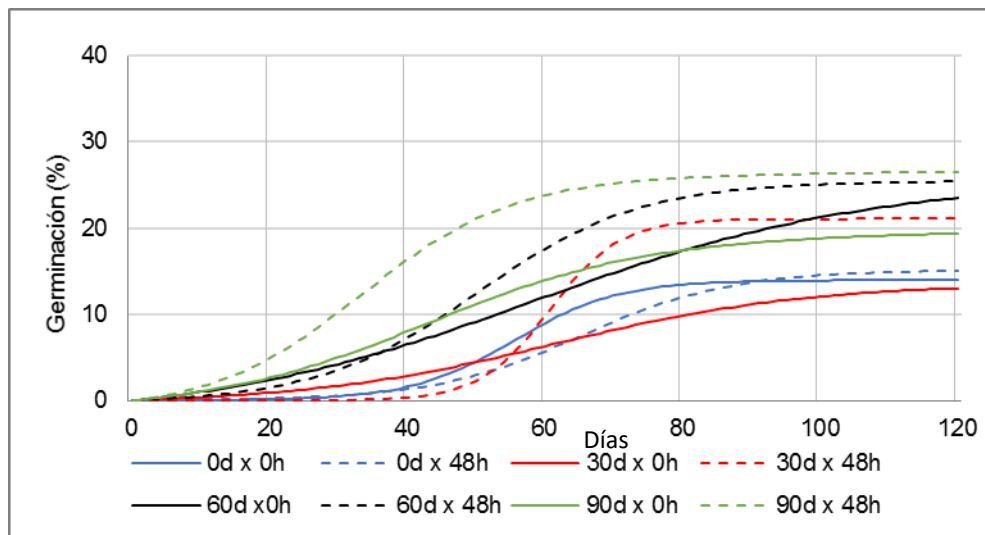


Figura 2.8.2.1. Representación gráfica del efecto de la interacción “Periodo de estratificación x Remojo previo”, en la germinación acumulada de la tabla 2.8.2.3.

La germinación acumulada fue afectada ($P \leq 0.01$) por la interacción “Periodo de estratificación x Adición de AG_3 al sustrato”, de manera que (Tabla 2.8.2.3; Figura 2.8.2.2) sin la adición de AG_3 al sustrato la germinación más elevada (30.6 %) se obtuvo con el mayor periodo de estratificación (90 d), en cambio el incremento de germinación que supuso la adición de AG_3 al sustrato en este periodo (26.9 %) fue inferior al obtenido en los otros periodos (37.6, 77.1, 88.5 % en los periodos de estratificación de 0, 30 y 60 d, respectivamente). Con la adición de AG_3 , el tiempo para alcanzar el 50% de la germinación acumulada se redujo ($P \leq 0.05$) más de un mes en los tratamientos control y de 30 y 60 d, mientras que en el tratamiento de 90 d solo se redujo 10 d. La velocidad de germinación aumentó significativamente ($P \leq 0.05$) con la adición de AG_3 únicamente en el tratamiento control (Tabla 2.8.2.3).

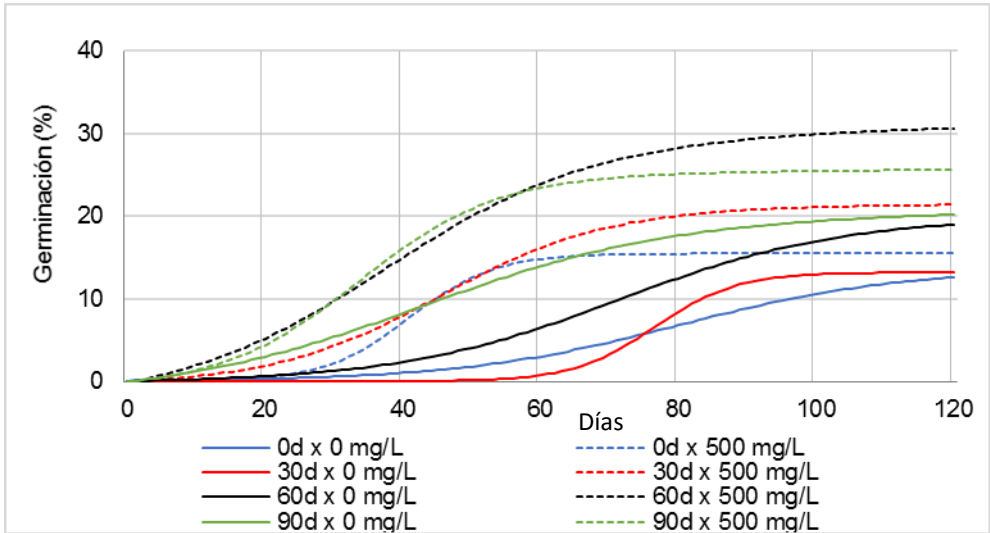


Figura 2.8.2.2. Representación gráfica de la interacción “Periodo de estratificación x Adición de AG₃” de la tabla 2.8.2.3.

El remojo previo mejoró la germinación ($P \leq 0.05$) con la adición de AG₃ (Tabla 2.8.2.3; Figura 2.8.2.3). El remojo previo, la adición de AG₃, y la combinación de ambos, aumentaron la velocidad de germinación ($P \leq 0.05$) con respecto al control, sin diferencias entre ellos (Tabla 2.8.2.3; Figura 2.8.2.3).

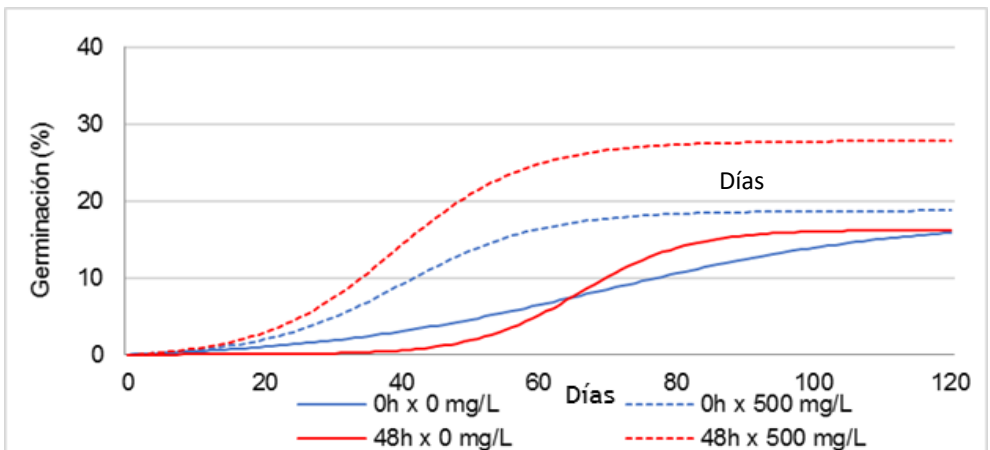


Figura 2.8.2.3. Representación gráfica de la interacción “Remojo previo x Adición de AG₃”, de la tabla 2.8.2.3.

2.8.2.2.2. Evolución de del contenido hormonal

La evolución del contenido hormonal obtenida durante la estratificación refrigerada de las semillas (Figura 2.8.2.4) coincide plenamente con el modelo de evolución trifásico, típico de las semillas de muchas especies durante los tratamientos a que son sometidas para superar la latencia fisiológica (Khan, 1980/81; Hartmann *et al.*, 2002): en la primera fase se produce una disminución del contenido en ABA; la segunda fase se caracteriza por un incremento de la síntesis de GAs y CKs; en la tercera fase puede producirse una disminución de la síntesis de hormonas, como preparación a la germinación (Hartmann *et al.*, 2002). Este modelo es exactamente el que se ha obtenido en este estudio, con una disminución del contenido en ABA, muy marcada durante los primeros 15 d (y en menor medida a partir de entonces; primera fase), un incremento de las CKs desde el inicio de la estratificación y de las GAs desde el día 45 (segunda fase), y una disminución de las GAs (a partir del día 60; tercera fase) y de las CKs (a partir del día 75). Es probable que junto al bajo contenido en GAs (libres) obtenido en el nonagésimo día de estratificación, exista un determinado contenido de GAs conjugadas, tal y como se ha comprobado que en la tercera fase de la estratificación de semillas de manzano, existen almacenadas formas conjugadas de GAs que posteriormente se convierten en formas activas durante la germinación (Halińska *et al.*, 1987). De hecho, la mayor germinación que se obtuvo sin la adición de AG₃ al sustrato, fue con la estratificación durante 90 d.

Los máximos niveles de GAs y CKs (Figura 2.8.2.4) determinados en las semillas estratificadas durante 60 d, coincidieron con los mejores resultados de germinación acumulada obtenidos (con la ayuda de la adición de AG₃ al sustrato, y sin diferencias durante los 50 primeros días del ensayo de germinación con respecto a la estratificación de 90 d; Tabla 2.8.2.3, Figura 2.8.2.2). Las hormonas más importantes en el control de la latencia de las semillas y de su superación, son ABA y GAs, siendo muy importante su interacción, es decir la relación GAs/ABA (Kucera *et al.*, 2005; Finch-

Savage y Leubner-Metzger, 2006), así como la sensibilidad de los tejidos de las semillas a las mismas (Hartmann *et al.*, 2014). En la figura 2.8.2.4 se presenta la evolución de la relación GAs/ABA, observándose que presenta una forma similar a la de la evolución de las GAs, y que su valor máximo coincide con el valor máximo de la germinación acumulada obtenida (con la adición de AG₃ al sustrato).

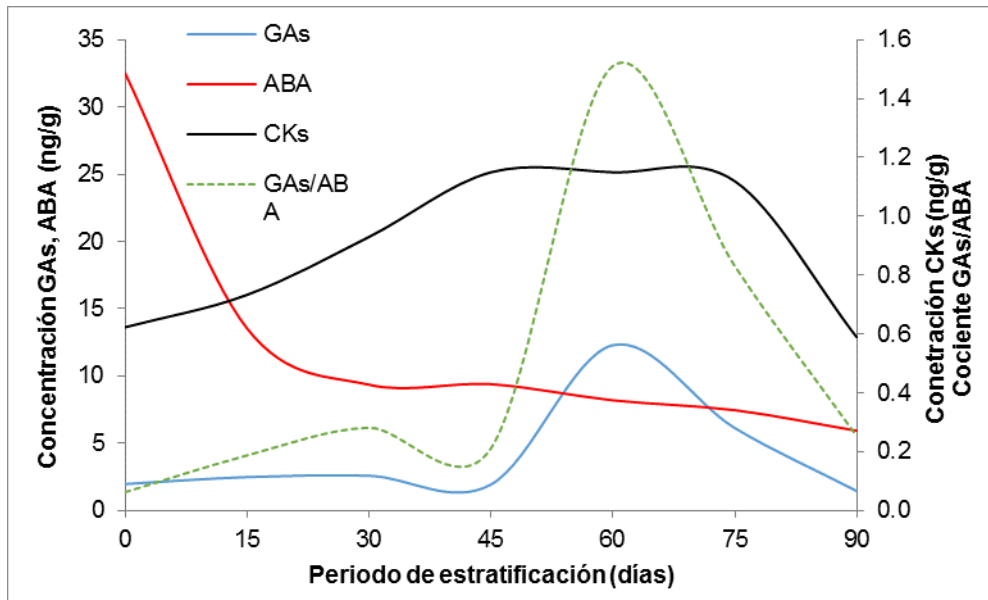


Figura 2.8.2.4. Evolución del contenido en giberelinas activas (GAs= GA1 + GA4), ácido abscísico (ABA) y citoquininas (CKs: isopenteniladenina + dihidrozeatina + trans-zeatina) durante la estratificación refrigerada de las semillas.

2.8.2.3. Conclusiones

La estratificación refrigerada de las semillas de *C. spinosa* subsp. *rupestris* adelanta su germinación y aumenta el porcentaje de germinación. La prolongación de la estratificación permite acortar el ensayo de germinación.

El remojo de 48 horas previo a la estratificación refrigerada, mejora el efecto de la estratificación refrigerada en la germinación.

La evolución del contenido hormonal durante la estratificación refrigerada de las semillas coincide totalmente con el modelo trifásico, típico de las semillas que presentan latencia embrional: (i) disminución del contenido en ABA en la primera fase; (ii) incremento del contenido en giberelinas y citoquininas en la segunda fase; (iii) disminución del contenido en giberelinas y citoquininas en la tercera fase.

A partir del momento en que se registra el mayor valor de la concentración de giberelinas, coincidente con el mayor valor de la relación giberelinas /ABA, se obtiene el mayor porcentaje de germinación, dependiendo la duración óptima de la estratificación de la adición, o no, de AG₃ al sustrato.

2.8.3. Efecto de la estratificación cálida en la germinación de las semillas de *C. spinosa* L. subsp. *rupestris*

2.8.3.1. Material y métodos

En el experimento de la estratificación cálida se establecieron cuatro periodos de estratificación, 0, 15, 30 y 45 d. Al igual que en el experimento de la estratificación refrigerada, a partir del lote de semillas recolectadas en

la primera semana de octubre de 2014, se formaron 4 grupos de semillas, de 8 g cada uno (con no menos de 900 semillas por grupo). El manejo de las semillas para la estratificación cálida fue idéntico al de la estratificación refrigerada, salvo que el régimen térmico en lugar de ser constante a 4°C, fue el correspondiente a los ensayos de germinación, 30/20°C día/noche, con fotoperiodo de 12 h. Los ensayos de germinación y los test de viabilidad, se realizaron siguiendo los procedimientos indicados en el experimento de la estratificación refrigerada. El test de viabilidad se realizó después de la estratificación, antes del ensayo de germinación, y después del mismo con las semillas no germinadas.

2.8.3.2. Resultados y discusión

La viabilidad inicial de las semillas (84 %) coincidía con la de las semillas utilizadas en el estudio de la estratificación refrigerada (85 %), lo que resulta lógico, puesto que pertenecían al mismo lote.

La estratificación cálida redujo significativamente ($P \leq 0,01$) la viabilidad de las semillas, de manera que el porcentaje de semillas viables (consideradas como semillas con tejidos tipo A) se redujo a medida que se alargó el periodo de estratificación (15, 30 y 45 d), concretamente desde el 85% de viabilidad de las semillas control hasta el 65% de viabilidad de las semillas estratificadas durante 45 días (Tabla 2.8.3.1).

Tabla 2.8.3.1. Viabilidad de las semillas obtenida en el ensayo al tetrazolio realizado después del periodo de estratificación cálida, expresada en porcentaje de semillas con:(A) tejidos sanos, (B) tejidos débiles y viables, (C) tejidos teñidos no viables y (D) tejidos no teñidos, muertos.

	A (%)	B (%)	C (%)	D (%)
Periodo estratificación (PE)				
0 d	85 a	10.0 b	5.0	0
15 d	80 ab	12.5 b	7.5	0
30 d	75 b	17.5 b	7.5	0
45 d	65 c	27.5 a	7.5	0

Factores (grados de libertad)	% Suma de cuadrados			
PE (3)	63.64 **	62.84 **	1.99 NS	- -
Residual (12)	36.36	37.16	98.01	-
Desviación estándar (+)	6.45	5.95	8.78	-

Letras distintas en una misma columna indican diferencias significativas con ($p \leq 0.05$) según el test LSD. NS No significativo. ** Nivel de significación ($p \leq 0.01$). (+) La desviación estándar se ha calculado como la raíz cuadrada del cuadrado medio residual.

Del análisis de la interacción significativa “Periodo de estratificación x Adición de AG₃ al sustrato” se desprende que la estratificación cálida aumentó ($P \leq 0.05$) la germinación acumulada, sin detectarse diferencias significativas ($P \leq 0.05$) entre los distintos periodos ensayados. La adición de AG₃ al sustrato, tras cualquier periodo de estratificación, también aumentó ($P \leq 0.05$) la germinación acumulada (Figura 2.8.3.1), existiendo diferencias ($P \leq 0.05$) tanto entre las distintas combinaciones estratificación - adición de AG₃, como con respecto a la no estratificación, obteniéndose el mejor resultado con el tratamiento de estratificación de las semillas durante 15 días, seguida de la germinación en sustrato con AG₃, con que se alcanzó una germinación del 77 %, valor que suponía la germinación del 90.6 % de las semillas inicialmente viables del lote (Tablas 2.8.3.1, 2.8.3.3; Figura 292

2.8.3.1). La adición de AG₃ al sustrato disminuyó el t₅₀ ($p \leq 0.05$) en todos los casos, y aumentó la velocidad media relativa tanto en el control (0 d de estratificación), como en la estratificación de 45 días ($p \leq 0.05$; Figura 2.8.3.2; Tabla 2.8.3.3)

Tabla 2.8.3.2. Influencia de la estratificación cálida y la adición de AG₃ al sustrato, en la germinación acumulada (G), máximo porcentaje de germinación (A), número de días necesarios para alcanzar el 50 % de la germinación final (t₅₀) y velocidad media relativa de germinación acumulada (k/2).

	G (%)	A (%)	t ₅₀ (d)	k/2 (d ⁻¹)
Periodo estratificación (PE)				
0 d	13.88 d	13.94 d	55.55 a	0.066
15 d	53.75 a	54.33 a	59.23 a	0.071
30 d	42.25 b	42.72 b	51.21 b	0.063
45 d	35.50 c	35.79 c	40.24 c	0.077
AG₃				
Agua	24.75 b	25.49 b	66.20 a	0.055 a
AG ₃	47.94 a	47.90 a	36.92 b	0.084 b
Análisis de la Varianza				
Factores (grados de libertad)	% Suma de cuadrados			
PE (3)	49.75 **	50.47 **	17.13 **	2.544 NS
AG ₃ (1)	31.71 **	29.29 **	72.37 **	19.292 **
PE x AG ₃ (3)	15.35 **	16.97 **	6.85 **	25.514 *
Residual (24)	3.19	3.27	3.64	52.651
Desviación estándar (+)	4.25	4.32	3.79	0.027

Letras distintas en una misma columna indican diferencias significativas con ($p \leq 0.05$) según el test LSD. NS No significativo. ** Nivel de significación ($p \leq 0.01$). (+) La desviación estándar se ha calculado como la raíz cuadrada del cuadrado medio residual.

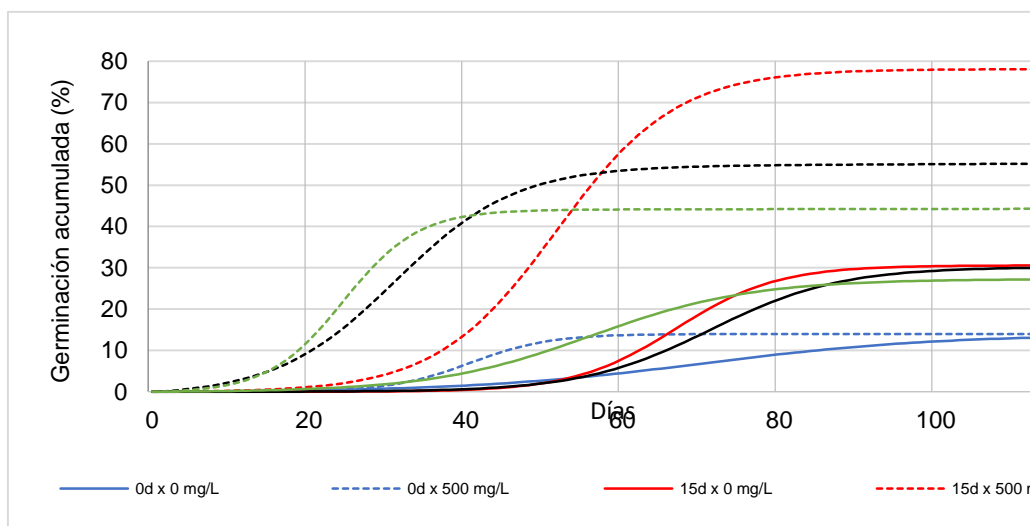


Figura 2.8.3.1. Representación gráfica de la interacción “Periodo de estratificación x Adición de AG₃ al sustrato”, de la tabla 2.8.3.2.

Tabla 2.8.3.3. Efecto de la interacción significativa “Periodo de estratificación x Adición de AG₃ al sustrato”, de la tabla 2.8.3.2, en la germinación acumulada (G), máximo porcentaje de germinación (A), número de días necesarios para alcanzar el 50% de la germinación final (t_{50}), y velocidad media relativa de germinación acumulada ($k/2$).

	G (%)	A (%)	t_{50} (d)	$k/2$ (d ⁻¹)
PE x AG ₃				
0d x Agua	13.00	13.90	70.51	0.033
0d x AG ₃	14.75	13.99	40.60	0.099
15d x Agua	30.50	30.58	66.84	0.077
15d x AG ₃	77.00	78.08	51.61	0.065
30d x Agua	29.00	30.18	71.35	0.061
30d x AG ₃	55.50	55.25	31.08	0.066
45d x Agua	26.50	27.30	56.10	0.049
45d x AG ₃	44.50	44.29	24.39	0.105
LSD ($p \leq 0,05$)	6.20	6.31	5.54	0.039

Cabe pensar que al igual que ha ocurrido en el estudio de la incubación enzimática, que la combinación de la estratificación cálida y la adición de AG₃ al sustrato de germinación, podría haber aumentado el potencial germinativo de las semillas, consiguiéndose la germinación del 90% de las semillas inicialmente viables.

2.8.3.3. Conclusiones

La estratificación cálida de las semillas mejora y adelanta la germinación de las semillas de *C. spinosa* subsp. *rupestris*.

La adición de AG₃ adelanta la germinación de las semillas.

Con la estratificación cálida durante un periodo de 15 días y la adición de AG₃ al sustrato se han obtenido porcentajes de germinación que superan el 90% de las semillas viables.

2.9. DISCUSIÓN GENERAL

La propagación sexual de *C. spinosa* L. puede calificarse como problemática, dado que lo es la germinación de sus semillas, que es lenta y presenta bajos porcentajes de germinación, y además es errática, no siendo extraño la existencia de lotes de semilla, tanto comerciales, como no comerciales, que presentan una germinación nula. No es de extrañar que se hayan realizado muchos estudios sobre la germinación de estas semillas, en diversos países como Argentina (Sozzi & Chiesa 1995), Chipre (Orphanos 1983), Italia (Barbera y Di Lorenzo, 1984; Macchia y Casano, 1993), España (Reche 1967; Luna y Pérez 1985; Pascual *et al.*, 2003, 2004, 2006 b, 2009; Pascual-Seva *et al.*, 2009), India (Singh *et al.*, 1992), Irán (Bahrani *et al.*, 2008) y Turquía (Tansi, 1999; Yildirim y Bayram, 2001; Olmez *et al.*, 2006; Basbag *et al.*, 2009).

Pascual *et al.* (2003, 2004, 2009) constataron diferencias en la germinación de las semillas correspondientes a diferentes posiciones del fruto en la planta madre, peso y madurez del fruto, así como la influencia de distintos métodos de escarificación y remojo de las semillas, y su aplicación en combinación o no, con la adición de AG_3 o de NO_3K , en la germinación. También constataron la existencia de determinados lotes de semillas que presentaban un porcentaje de germinación nulo (Pascual, comunicación personal).

En diversas estudios realizadas por diversos investigadores o equipos de investigación (Orphanos, 1983; Macchia y Casano, 1993; Sozzi y Chiesa, 1995; Tansi, 1999; Rinaldelli, 2000; Pascual *et al.*, 2004; Bahrani *et al.*, 2008) se ha constatado que la escarificación de las semillas, seguida de la inmersión en, o de la adición al sustrato de, una solución de AG_3 , mejora la germinación de las semillas de *C. spinosa*, de lo que se ha concluido que no había una única causa de la latencia de esta semillas, y que además de la latencia fisiológica (LFg), la cubierta de la semilla también ejercía una barrera para la absorción de agua, y que en consecuencia la cubierta dura de esta semilla provocaba una latencia de tipo físico.

No obstante, la realidad es que la única manera de conocer si la cubierta dura de una semilla realmente impide la absorción de agua, es determinar su imbibición (Baskin y Baskin, 2004; Orozco-Segovia *et al.*, 2007). En los apartados 2.5.3 a 2.5.6 se ha constatado que la imbibición se inicia inmediatamente después de ser puestas a remojo, y la estabilización se produce tras un periodo variable de 2 a 8 días, por lo que puede afirmarse que las cubiertas de las semillas, consideradas en sentido amplio (incluyendo el hilo), no son impermeables al agua, permitiendo la absorción de la misma, al ser puestas a remojo.

Durante los dos primeros días el valor de la imbibición obtenida con el papel de filtro humedecido en las placas Petri ha resultado ligeramente inferior al obtenido en las semillas en remojo, pero pronto se igualan, de manera que a partir del sexto día ya no se aprecian diferencias, por lo que la imbibición también tiene lugar cuando las semillas se ponen a germinar en sustrato (papel de filtro) húmedo.

La separación de la cubierta del endospermo tras el periodo de remojo ha permitido determinar que la humedad del endospermo (que rodea al embrión) se ha incrementado en más del 50% de su valor inicial, y, por lo tanto, puede concluirse que con el remojo se produce una importante absorción de agua en el endospermo.

La semilla es bitécnica (apartado 2.3), de manera que la cubierta está formada por testa, con epidermis formada por 5-6 capas de células de espesor, y tegmen. El tegmen consiste en un exotegmen fibroso y lignificado, un mesotegmen sin lignificar y un endotegmen lignificado. Aparentemente en la cubierta de las semillas no existe ninguna capa de células en empalizada que haga a la cubierta impermeable al agua (Baskin y Baskin, 2004), siendo el exotegmen, fibroso y lignificado, el que parece restringir la imbibición.

La utilización del colorante azul de metileno ha permitido observar que la imbibición del mismo se produce a través del hilo, llega a la zona chalazal a través de la cual penetra en el endospermo y avanza progresivamente hasta colorear completamente el embrión. La hendidura de

la semilla presenta una discontinuidad del exotegmen, que parece comportarse como una puerta de entrada de agua cuando las semillas se encuentran en un sustrato húmedo (apartado 2.3.5.2).

La utilización del colorante azul de metileno ha permitido observar que la imbibición del mismo se produce a través del hilo, por el “canal de agua” llega a la zona chalazal, a través de la cual penetra en el endospermo y avanza progresivamente hasta colorear completamente el embrión.

Aunque la imbibición registrada en las semillas de *C. spinosa* L. subsp. *rupestris* es inferior a la citada en la bibliografía en semillas de otras especies que no presentan problemas en la absorción de agua en la germinación, las cubiertas de las semillas, consideradas en sentido amplio (incluyendo al hilo), no son impermeables al agua, permitiendo la absorción de la misma, al ser puestas a remojo o germinar en un sustrato húmedo, es decir que no presentan latencia física.

Todas las curvas de germinación obtenidas en los diferentes apartados de esta tesis doctoral han presentado unos elevados coeficientes de correlación, y el modelo logístico ha resultado significativo; por tanto, la función logística es adecuada para analizar la germinación de los dos lotes de semillas de *C. spinosa* utilizados, tal y como lo fue en anteriores estudios realizados sobre la germinación de semillas de alcaparra (Pascual *et al.*, 2006; Pascual *et al.*, 2009), y de otros cultivos (Hsu *et al.*, 1984; Torres y Frutos, 1990; Tei y Ciricofolo, 1997; Hara, 1999). La posibilidad del uso de la función logística permite el uso de las variables A , β y k .

De acuerdo con Justice y Bass (1979), las curvas de supervivencia, determinadas en condiciones ambientales constantes, tanto considerando la viabilidad como la germinación de las semillas, tienen forma sigmoidea, distinguiéndose tres fases (apartado 2.6.2.3). En la primera fase la semilla es vigorosa, y la disminución de las funciones vitales de las semillas ha avanzado lentamente, finalizando cuando el nivel de viabilidad/germinación está próximo al 85% (a los dos años de almacenamiento), y entonces el deterioro aumenta más rápido hasta alcanzar un nivel de supervivencia del orden del 20% (fase segunda, aproximadamente hasta 6 años), en que se

ralentiza de nuevo y continúa disminuyendo más lentamente hasta que prácticamente se anula (fase tercera).

Las curvas de supervivencia se ajustan a la distribución normal acumulada negativa (Ellis y Roberts, 1980), lo que ha permitido utilizar el análisis probit (Finney, 1962) para determinar el periodo de viabilidad media, cuyo valor ha estado entre 4.1 y 4.4 años, que es similar, al de las semillas de brócoli, col y coliflor, maíz dulce, pepino, melón y guisante (Justice y Bass, 1979; Copeland y McDonald, 1995), por lo que no se aconseja la utilización de semillas de más de cuatro años de edad.

La longevidad de las semillas depende del deterioro que sufren las mismas durante el almacenamiento, que a su vez depende por una parte del ambiente del almacenamiento, y por otra de varios factores intrínsecos de las semillas, que en conjunto se denominan “calidad de la semilla” (tolerancia al secado, madurez, latencia, morfología, composición, tolerancia al estrés, además evidentemente de la composición genética; Walters, 2006).

El factor, probablemente, más importante que determina la longevidad de las semillas es el grado en que la semilla sobrevive al secado (Walters, 2006). Las semillas de muchas especies adquieren durante la maduración la habilidad de supervivencia tras el secado, por lo que la longevidad de cada lote de semillas puede depender del estado hídrico y nutricional y de las condiciones ambientales en las que se produce la maduración de las semillas; igualmente, la longevidad de las semillas también puede depender de la composición y cantidad de reservas que posean las mismas (Walters, 2006), que a su vez también depende de los mismos factores. Por tanto, no es de extrañar que lotes de semillas producidas, incluso en la misma parcela, en distintas campañas, o en distintos periodos de la misma campaña, o que se hayan recolectado con criterios diferentes, y posiblemente se hayan almacenado en ambientes diferentes, presenten longevidades diferentes; no obstante, la longevidad de todos los lotes de semillas de *C. spinosa* analizados presentan una longevidad en torno a los cuatro años.

En cuanto al inicio de los ensayos de germinación dentro de la propia campaña, se ha constatado que comenzando el ensayo de germinación el mismo día de la recolección, y por tanto inmediatamente después de la dehiscencia, cuando todavía no se ha iniciado el proceso de secado de las semillas, y por tanto su deterioro, se han obtenido porcentajes de germinación muy próximos al 100%, descendiendo este valor a medida que ha aumentado el periodo transcurrido, probablemente debido al inicio y progreso del deterioro de las semillas provocando un descenso del porcentaje de germinación (apartado 2.5.4). En este sentido se aconseja no retrasar el inicio del ensayo de germinación más de 30 días, para poder obtener porcentajes de germinación muy elevados (superiores al 90%, aunque este valor puede depender del propio lote de semillas). Estos resultados no coinciden con los obtenidos por Yildirim y Bayram, 2001) quienes concluyeron que debía de utilizarse semillas bien secas.

Al comparar la viabilidad y la germinación de las semillas de la subespecie *rupestris* y *spinosa* pertenecientes a sendos lotes producidos y recolectados en las mismas condiciones, se constata que las semillas de las dos subespecies presentan la misma viabilidad, pero la subsp. *rupestris* presenta un mayor porcentaje de germinación (apartado 2.4).

Con la incubación enzimática se consigue la escarificación de estas semillas, por tanto, es una escarificación enzimática, como lo demuestran los análisis de las propias semillas y de las soluciones del complejo enzimático al finalizar la incubación (apartado 2.7.3). No obstante, ya que la posible restricción de la imbibición por parte de la cubierta no parece ser un factor fundamental en la germinación, es posible que con la incubación enzimática se haya conseguido el debilitamiento de los tejidos que dificultan la expansión del embrión, que son el endospermo y la cubierta de la semilla (Hilhorst y Karseen, 1992; Sánchez y de Miguel, 1997; Koornneef *et al.*, 2002). Adicionalmente a este efecto, es posible que la incubación enzimática acelere la lixiviación de ABA (Yambe y Takeno, 1992), aunque esta hipótesis necesitaría ser comprobada. También cabe pensar que la combinación de la incubación con el complejo *Trichoderma reesei* y la adición de AG₃ al sustrato de germinación, puede aumentar el potencial

germinativo de las semillas (de acuerdo con Still y Bradford, 1997, y con Groot *et al.*, 1988), habiéndose conseguido en este estudio la germinación del 100% de las semillas.

Todos los ensayos de germinación realizados en esta tesis doctoral se han realizado humedeciendo el sustrato (papel de filtro) con agua y con una solución de AG₃, constatándose que la adición de AG₃ al sustrato adelanta y aumenta la germinación de las semillas, consiguiendo que en la mayoría de las ocasiones germinen prácticamente todas las semillas viables, lo que parece confirmar la hipótesis de que las semillas de *C. spinosa* presentan latencia fisiológica, tal y como indican diversos estudios Orphanos, 1983; Sozzi y Chiesa, 1995;; Pascual *et al.*, 2004, 2208, 2009; Bahrani *et al.*, 2008), citados todos ellos por Baskin y Baskin (2014).

La estratificación refrigerada de las semillas ha disminuido su viabilidad, aumentando la pérdida de viabilidad con la prolongación del periodo de estratificación (apartado 2.8.2). En cambio, el porcentaje de germinación ha aumentado con esta estratificación refrigerada, y la germinación obtenida ha sido mayor cuando las semillas han estado previamente a remojo, de acuerdo con Gosling (2006), quien afirma que la respuesta más rápida a la estratificación refrigerada se produce a contenidos de humedad un poco por debajo de la imbibición total. El incremento obtenido en este estudio es inferior al obtenido por Olmez *et al.* (2004, 2006) con semillas de *C. ovata*.

La evolución del contenido hormonal durante la estratificación refrigerada de las semillas coincide totalmente con el modelo trifásico, típico de las semillas que presentan latencia embrionaria (Khan, 1980/81; Hartmann *et al.*, 2002): (i) disminución del contenido en ABA en la primera fase; (ii) incremento del contenido en giberelinas (GAs) y citoquininas en la segunda fase; (iii) disminución del contenido en GAs y citoquininas en la tercera fase. Es probable que junto al bajo contenido en GAs (libres) obtenido en la tercera fase de la estratificación, exista un determinado contenido de GAs conjugadas, que posteriormente se convierten en formas activas durante la germinación (Halińska *et al.*, 1987). De hecho, la mayor

germinación que se obtuvo sin la adición de AG₃ al sustrato, fue con la estratificación durante 90 días.

A partir del momento en que se ha registrado el mayor valor de la concentración de GAs, coincidente con el mayor valor de la relación GAs/ABA, se ha obtenido el mayor porcentaje de germinación, dependiendo la duración óptima de la estratificación, de la adición, o no, de AG₃ al sustrato. Estos resultados son acordes con la hipótesis de que las hormonas más importantes en el control de la latencia de las semillas y de su superación, son el ABA y las GAs, siendo muy importante su interacción, es decir la relación GAs/ABA (Kucera *et al.*, 2005; Finch-Sauvage y Leubner-Metzger, 2006), así como la sensibilidad de los tejidos de las semillas a las mismas (Hartmann *et al.*, 2014).

Al igual que en la estratificación refrigerada, la estratificación cálida ha disminuido la viabilidad, tanto más cuanto mayor ha sido su duración, y ha aumentado el porcentaje de germinación de las semillas, sin diferencias significativas en cuanto a la duración de la estratificación (apartado 2.8.3). La adición de AG₃ al sustrato tras cualquier periodo de estratificación, también ha aumentado y adelantado la germinación. Con la estratificación cálida se han conseguido porcentajes de germinación que superan el 90% de las semillas viables, en un lote en el que el tratamiento control ha alcanzado el 15.3% de las semillas viables y el tratamiento único de AG₃ el 17.4% de las semillas viables. Es posible que al igual que ha ocurrido en el estudio de la incubación enzimática, que la combinación de la estratificación cálida y la adición de AG₃ al sustrato de germinación, pueda haber aumentado el potencial germinativo de las semillas, consiguiéndose valores de germinación muy elevados con respecto a las semillas inicialmente viables.

A la vista de los resultados obtenidos en estos apartados de la tesis doctoral (2.3 a 2.8), de la utilización de la clave dicotómica más reciente (Baskin y Baskin, 2014), presentada en la tabla 2.1.4, se concluye que las semillas de *C. spinosa* presentan latencia fisiológica ordinaria (*regular*). Según la clasificación propuesta por los mismos autores con anterioridad

(Tabla 2.1.2; Baskin y Baskin, 2004) la latencia de estas semillas es fisiológica no profunda (*Physiological non-deep*).

3. REPRODUCCIÓN ASEXUAL O VEGETATIVA

3.1. INTRODUCCIÓN

Como se ha visto en el apartado 2 de esta Tesis Doctoral, la propagación sexual de la alcaparra presenta problemas, por lo que la propagación vegetativa es una alternativa común en el cultivo.

La reproducción asexual de *C. spinosa* puede llevarse a cabo por esquejes, micropropagación, injerto, ..., pero sin duda, el más utilizado es el estaquillado. No obstante, presenta una serie de problemas, a los cuales se está tratando de encontrar su origen, habiéndose realizado diferentes estudios para intentar mejorar el enraizamiento y obtener valores de prendimiento superiores a los actuales.

Dada la importancia económica de la propagación vegetativa es normal que los investigadores hayan intentado desarrollar nuevos tratamientos para el enraizamiento, particularmente ensayando la utilización de reguladores de crecimiento. A pesar de ello no han aparecido nuevos tratamientos. Las estaquillas se siguen tratando generalmente con preparaciones en forma de talco, o bien se utilizan soluciones sumergiendo la base de la estaquilla durante una breve exposición de auxinas de alta concentración. La influencia de las auxinas sobre la rizogénesis de las plantas (Suleiman *et al.*, 2012) y el estado fisiológico en el momento de realizar los esquejes pueden ser determinantemente a la hora del enraizamiento (Pascual *et al.*, 2007).

3.1.1. Esquejes

El estaquillado (Figura 3.1.1) es una técnica de multiplicación vegetativa que consiste en provocar el enraizamiento y la brotación de fragmentos de plantas: tallos, raíces u hojas. Los viveristas utilizan este

método al permitir una propagación rápida, y generalmente de bajo coste, de numerosas plantas, que conservan las características de la planta madre.



Fotografía 3.1.1. Vista de una plantación de estaquillas de alcaparra antes de su brotación.

El método de reproducción asexual más difundido en la alcaparra es el estaquillado. Ésta se puede propagar por estacas de tallo, leñosas, semileñosas y herbáceas, pero su difícil enraizamiento y la gran variabilidad en los resultados obtenidos con diferente material vegetal (entre especies, subespecies, cultivares, clones e incluso entre tallos de una misma planta), hacen que los viveristas sean reacios a la utilización del estaquillado, tanto para su uso en agricultura como planta ornamental.

Según indica Huenca (2010), las estaquillas se deben obtener de plantas madre sanas, vigorosas y situadas en lugares luminosos. Las estaquillas se colocan en un medio favorable para su enraizamiento. En el caso de la alcaparra, pueden utilizarse diferentes medios de cultivo, entre los que destaca la turba por ser uno de los sustratos más utilizados por sus características: alta retención de agua, ausencia de patógenos y plagas (debido a su origen), bajo nivel de pH y con adecuada capacidad de cambio (lo que permite que la planta pueda extraer los nutrientes en función de sus necesidades), y además de un precio competitivo (Schmilewski, 2009). La formación de raíces, se ve condicionada por varios factores como, el nivel hormonal (las auxinas y citoquininas favorecen el enraizamiento y las giberelinas lo inhiben; Jordán y Casaretto, 2006), factores ambientales (el agua, la luz, la temperatura, etc.) y por la polaridad. Tras el enraizamiento y la brotación la estaquilla se trasplanta para convertirse en plantas adultas.

El estudio de los efectos sobre la mejora de la rizogénesis conseguidos en otras especies vegetales con la aplicación de auxinas como el ácido indolbutírico (AIB) o el ácido naftalenacetético (ANA), ha dado resultados erráticos en la mayoría de los casos (Latsague *et al.*, 2009; Suleiman *et al.*, 2012). Según Blakesley *et al.* (1991), los niveles endógenos de ácido indolacético y ácido abscísico son los responsables de la estimulación e inhibición de raíces adventicias. La inmersión del extremo basal de corte en 1500 y 3000 mg L⁻¹ de solución de auxina puede mejorar el enraizamiento (Pilone 1990), pero los resultados dependen del tipo de corte. Las estacas de madera dura no parecen responder a los pretratamientos de AIB o de ANA. Por otra parte, la inmersión de la base de corte herbáceo en ANA de 2000 mg L⁻¹ proporciona porcentajes de enraizamiento del 83% (Luna y Pérez, 1985).

Las plantas de alcaparra obtenidas a partir de esquejes tienen una ventaja sobre las plantas propagadas por las semillas: son clones. Esta práctica evita la alta variabilidad en términos de producción y calidad. Sin embargo, las plantas cultivadas a partir de esquejes son más susceptibles a la sequía durante los primeros años después de la siembra.

La alcaparra es una especie arbustiva difícil de arraigar. La propagación exitosa requiere una cuidadosa consideración de los ecotipos, así como parámetros estacionales y ambientales. La propagación de estacas es el método estándar para el cultivo de 'Mallorquina' e 'Italiana' en España, y 'Nocella' en la isla de Salina (Italia). En la isla de Pantelleria (Italia), el enraizado de estacas no produjo buenos resultados (Barbera y Di Lorenzo, 1984). El corte de la madera dura, generalmente se utiliza para propagar 'Mallorquina', obteniendo estaquillas, cuando las plantas todavía están latentes, de brotes de un año de edad, de 2.0 a 2.5 cm de diámetro, obteniendo secciones de 20 a 30 cm de largo. Cuando las estacas son de al menos 1,5 cm de diámetro, son posibles porcentajes de enraizamiento del 55% (Istituto di Coltivazioni Arboree, Università degli Studi di Palermo, inédito). Los brotes se plantan en bandejas individuales o en líneas dentro del vivero con un ambiente húmedo. Los porcentajes de enraizamiento dependen del estado fisiológico y el sustrato utilizado (Pilone, 1990). Otra posibilidad es recolectar los tallos durante el mes de febrero a principios de marzo, pretratarlos con fungicida y estratificarlos en el exterior o en el frigorífico a 3-4°C, cubiertos con arena o en una bolsa de plástico. El contenido de humedad y el drenaje deben ser cuidadosamente monitoreados y mantenidos hasta la plantación (Luna y Pérez, 1985). Utilizando esquejes semi-duros, recolectados y plantados durante agosto y septiembre, se han obtenido bajas tasas de supervivencia (menos del 30 %).

En los últimos años se han desarrollado estudios fisiológicos con diferentes subespecies con el fin de mejorar la capacidad de rizogénesis (Malgarejo, 2000; Latsague *et al.*, 2008; Pascual *et al.*, 2008; Suleiman *et al.*, 2012).

En las condiciones climáticas del Mediterráneo, el material vegetal para la reproducción por estaquillas suaves se realiza a partir de las brotaciones de marzo o abril y cuando éstas tienen una longitud entre 5 y 10 cm, sin brotaciones laterales, dejando una hoja, en caso de estaquillas no apicales, y varias hojas pequeñas en el caso de estaquillas apicales (Malgarejo, 2000). Cada corte debe contener al menos 2 nudos. Las estacas basales son más exitosas que las terminales. Luego, las estacas se mantienen

en un invernadero bajo un sistema de nebulización en bancadas provistas de un circuito de agua caliente. Se pueden plantar de 150 a 200 esquejes por metro cuadrado.

3.1.2. Micropropagación

La micropropagación a partir de segmentos nodales, óvulos no fecundados, u otras partes de la planta que solo intervenga un parental, es la más recomendable porque elimina la heterogeneidad encontrada en las plantas de reproducción por semilla.

El cultivo *in vitro* de alcaparra se estudia por primera vez en 1984 por Ancara y Cuozzo usando material vegetal (Carra *et al.*, 2012). Posteriormente la propagación a partir de segmentos nodales fue estudiada por varios autores (Rodríguez *et al.*, 1990; Salem *et al.*, 2001; Chalak *et al.*, 2003; Chalak y Elbitar, 2006; Caglar *et al.*, 2005; Musallam *et al.*, 2010; Al-Safadi and Elias, 2011; Carra *et al.*, 2012 a; 2012 b).

La micropropagación *in vitro* de semillas de alcaparra es viable (Horshati y Jambor-Benezur, 2006; Movafeghi *et al.*, 2008), aunque pueden presentar la heterogeneidad típica de la reproducción sexual y una alta variabilidad entre los porcentajes de germinación de en función de los tratamientos realizados debido a su diferente eficiencia para romper la latencia.

Los tratamientos con germinación de semillas *in vitro* combinados con escarificación mecánica y 24 horas a una temperatura de 40°C en pregerminación. La escarificación mediante rotura de la capa de la semilla ha sido determinante para mejorar el porcentaje de germinación. Las plántulas obtenidas *in vitro* fueron valiosas para establecer un protocolo de micropropagación para la alcaparra (Germanà y Giancone, 2009; Saifi *et al.*, 2013).

Carra *et al.* (2012) mediante el cultivo *in vitro* de óvulos no fertilizados de *Capparis spinosa* L. consiguieron resultados del 100 % de explantos arraigados cuando fueron sometidos durante 10 min en 50 mg L⁻¹ de AIB. Las nuevas plantas eran vigorosas, de buena calidad y presentaron caracteres fenotípicos similares a plantas madre.

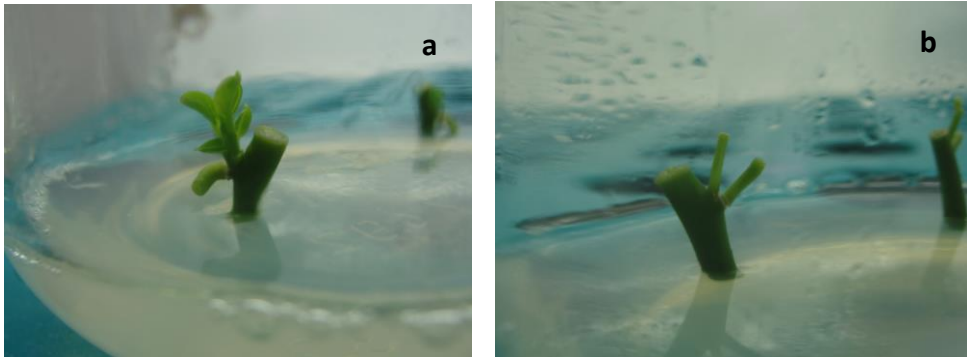
Ben Salem *et al.* (2001) obtuvieron éxitos superiores al 90 % de enraizamiento en la multiplicación de brotes *in vitro* tanto en posición horizontal como vertical.

La proliferación y el desarrollo de brotes se ven estimulados por la adición de 4 µM 6-bencilaminopurina; cuando se combinan con 0,3 µM ácido indolacético (IAA) y 0,3 µM GA₃, la formación de raíces mejora (Rodríguez *et al.*, 1990). Según Rodríguez *et al.* (1990) la aplicación de 30 mg L⁻¹ de AIA mejora la respuesta de enraizamiento. Los medios enriquecidos con sacarosa (Safrazbekyan *et al.*, 1990) previenen, en algunos casos, la presencia de brotes anormales. Debido a las dificultades de propagación convencional de la alcaparra, el cultivo *in vitro* es una técnica alternativa (Fotografía 3.1.2).



Fotografía 3.1.2. Plantas de *Capparis spinosa* subsp. *rupestris* propagadas *in vitro*.

En este apartado de la tesis doctoral se pretende poner a punto una técnica de propagación vegetativa que pueda ser realizada por los viveristas tradicionales, como el estaquillado; el objetivo de los trabajos realizados en cultivo *in vitro* de secciones nodales de tallo (datos no presentados) fue, además de comprobar la viabilidad del método, comprobar que únicamente brotaba una yema en cada nudo (Fotografía 3.1.3 a) y que una vez brotada la única yema existente no se desarrollaba ninguna yema adventicia (Fotografía 3.1.3 b). En la totalidad de los casos, únicamente se produjo brotación en los nudos que existía una yema, y que en ningún caso se desarrolló ninguna yema adventicia.



Fotografía 3.1.3. Estaquilla nodal brotada de *Capparis spinosa* subsp. *rupestris* en cultivo *in vitro* (a), y sin brotar en la que se observan las bases del peciolo y el pedúnculo floral (b). Fotografías cedidas por Alejandro Atarés.

3.1.3. Injerto

La realización del injerto puede tener interés para evitar la posible la heterogeneidad genética de las plantas obtenidas a partir de semillas, y/o para cultivar material vegetal con espinas de consistencia herbácea que permitan facilitar la recolección. El injerto, como técnica de propagación, es la menos utilizada en alcaparra.

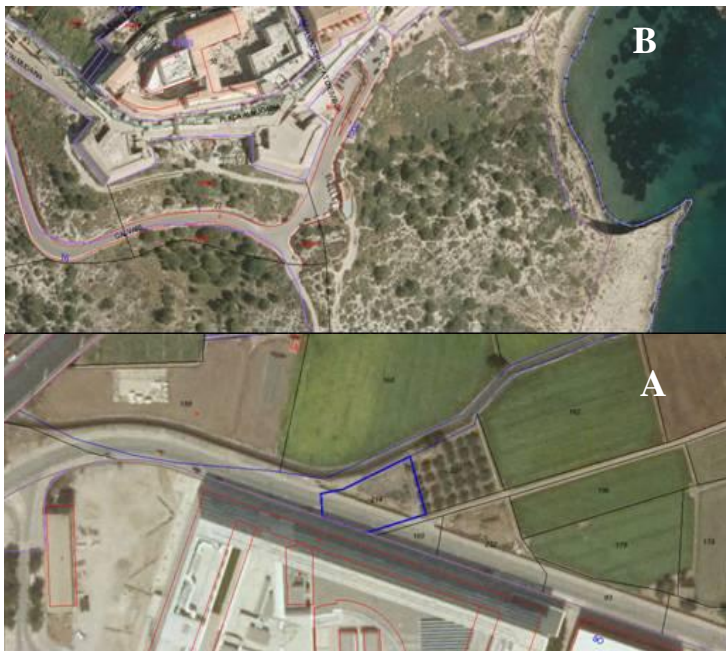
El tipo de injerto más utilizado por los viveristas en alcaparra es el de púa. El injerto se realiza cuando la variedad y el patrón están en brotación, practicando una hendidura en la base de los tallos. Las púas suelen cortarse de forma que tengan dos nudos con sus yemas axilares no brotadas y deshojadas antes de realizar el injerto. Las púas deben elegirse en la parte basal de las ramas evitando, en todos los casos, que sus yemas hayan brotado anteriormente. Una vez realizado el injerto se suelen atar ambas partes, patrón y variedad, con cinta de plástico protegiendo la zona del injerto con tierra húmeda durante los próximos meses. El porcentaje de multiplicación obtenido mediante estaquillas es muy variable, pudiendo alcanzar entre el 20 % obtenido por Ben Salem *et al.* (2001) en estaquillas suaves, de una variedad con espinas como portainjerto y sin espinas como sobreinjerto, cultivadas en lana de roca y el 70 % obtenido en estaquillas lignificadas (Luna y Pérez, 1985; Melgarejo, 2000).

En este apartado de la tesis doctoral no abordamos el injerto de alcaparra porque nuestro objetivo es obtener plantas directamente de estaquillas sin necesidad de utilizar la técnica del injerto por ser un procedimiento costoso y tener que recurrir, previamente, a la reproducción sexual, no exenta de problemas como hemos estudiado en los apartados anteriores.

3.2. MATERIAL Y MÉTODOS

3.2.1. Material vegetal

El material vegetal utilizado para la obtención de estaquillas procede de plantas madre de la misma parcela que se obtuvieron las semillas utilizadas en el apartado 2 de esta Tesis Doctoral (UPV; polígono 27, parcela 214, término municipal de Valencia) plantada con *C. spinosa* subsp. *spinosa* (plantas obtenidas a partir de material vegetal procedente de Mallorca) y *C. spinosa* subsp. *rupestris* (Fotografía 3.2.1 A; 3.2.2). Además, se utilizó material vegetal de *C. spinosa* subsp. *rupestris* (Fotografía 3.2.1 B; 3.3.3) procedente de plantas silvestres situadas entre las grietas rocosas, al abrigo de la muralla de la ciudad de Ibiza (Illes Balears).



Fotografía 3.2.1. Vista aérea de los lugares de obtención del material vegetal. Aledaños de las murallas de Ibiza (A) y parcela situada en la UPV (B). Fuente: MAPAMA, 2017.



Fotografía 3.2.2. Vista de las plantas madre de *Capparis spinosa* subsp. *spinosa* (a) y *Capparis spinosa* subsp. *rupestris* (b) de la parcela de la UPV.



Fotografía 3.2.3. Vista de las plantas madre silvestres de *Capparis spinosa* subsp. *rupestris* en las murallas de Ibiza (a) y en sus aledaños (b).

3.2.2. Locales

La plantación se realizó en los invernaderos (Fotografía 3.2.4) del Departamento de Producción Vegetal de la Escuela Técnica Superior de Ingeniería Agronómica y del Medio Natural, en la Universitat Politècnica de València, concretamente en el invernadero número 10. Los invernaderos, con cubierta de vidrio, están provistos de un control de temperatura mediante un sistema de refrigeración “Cooler system” (para mantener la temperatura por debajo de 28°C) y de calefacción por aerotermos (para mantener la temperatura por encima de 18°C), e implementado con un sistema automático de ventilación cenital. Los invernaderos también disponen de bancadas de obra con calefacción mediante tuberías de agua caliente que, junto con los demás mecanismos de regulación térmica, mantuvieron la temperatura del sustrato alrededor de 22°C.

La elección de este rango de temperaturas está en concordancia con los trabajos de Krüsmann (1981) y Santelices (2016), al aumentar la temperatura en la base de las estacas, dentro del rango indicado, se produce un aumento localizado de la respiración, lo que supuestamente lleva a una síntesis localizada de carbohidratos y a continuación a una intensa formación de protoplasma. Con esto se produce una mayor división celular en la zona basal y se favorece la formación de raíces adventicias. Con un rango adecuado de temperatura, que puede variar entre 15 y 26°C, no sólo se logra una mayor rapidez en la formación de raíces, sino que también se obtienen en mayor cantidad. Por otra parte, Sánchez y Justo (1997) encontraron, en estudios realizados en 4 especies de coníferas (Ciprés, Cedro, Tuya y Falso Ciprés), que el aumento de la temperatura en el sustrato influyó en forma negativa en la formación de callo y raíces, con mejores resultados sin calor de fondo.



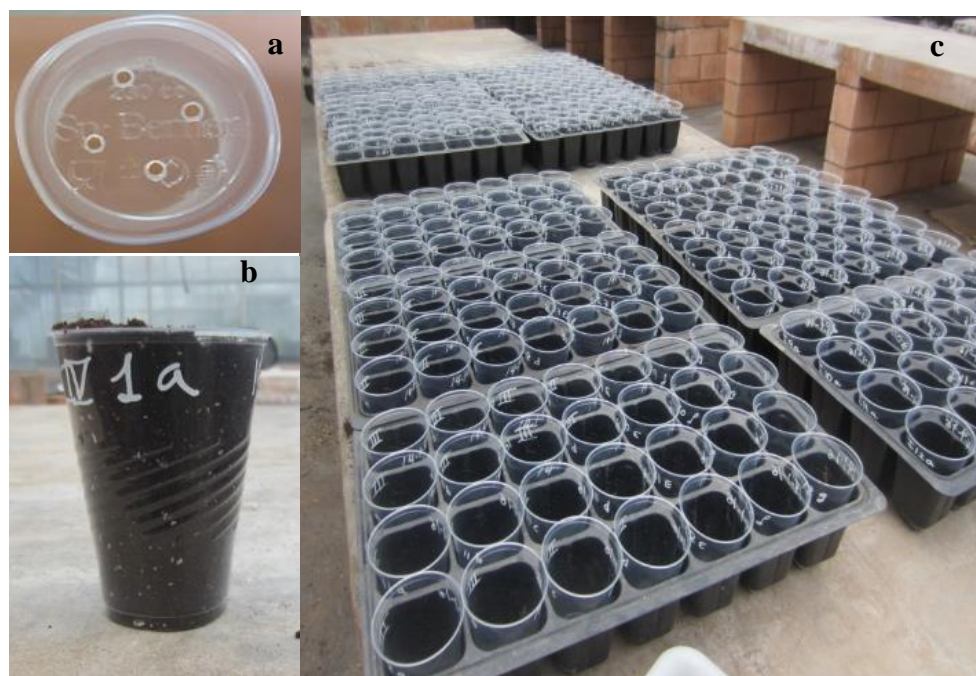
Fotografía 3.2.4. Vista general de las bancadas del invernadero.

3.2.3. Ensayos de estaquillado

Para la plantación de las estaquillas se utilizaron como contenedores, recipientes transparentes de 223 mL de capacidad (70 mm de diámetro superior, 45 mm de diámetro inferior y 100 mm de profundidad) con el fin de poder apreciar la presencia o ausencia de raíces durante el período de enraizamiento. Los recipientes con perforaciones en la parte inferior permitían un correcto riego y drenaje del sustrato (Fotografía 3.2.5 a). Los contenedores utilizados para las estaquillas suaves tenían una capacidad de 0,1 l, de 55 mm de diámetro superior, 40 mm de diámetro inferior y 60 mm de profundidad.

Los contenedores convenientemente preparados, se rellenaron con un sustrato a base de turba (50%) y perlita B-12 (50%), al ser el sustrato que mejores resultados dio en estudios anteriores. La turba, mezcla de turba sphagnum (70 %) y turba negra (30%), es un sustrato comercial (GRAMOFLOR®) especial para esquejes (Fotografía 3.2.5 b). La mezcla de turba y perlita se humedecía para facilitar el llenado de los contenedores y la plantación. Los vasos de plástico rellenos se introdujeron en bandejas de alveolos de (37 mm) que podían contener hasta 28 unidades (Fotografía 3.2.5 c). Los vasos fueron rotulados convenientemente con marcador permanente para su posterior identificación.

Antes de realizar la plantación, se midió la longitud y el diámetro de todas y cada una de las estaquillas. La longitud se midió con una regla graduada y el diámetro con un calibrador digital (POWERFIX PROFI+). Todas las estaquillas se sometieron a un tratamiento fúngico con N-(triclorometilto) ciclohex-4-eno-1,2-dicarboximida (Captan). El riego se realizó por inmersión en la base de las bandejas de alveolos, ascendiendo el agua de riego en el sustrato por capilaridad.



Fotografía 3.2.5. Detalle de un contenedor perforado en la parte inferior (a). Contenedor relleno de sustrato y correctamente rotulado (b). Bandejas de alveolos con los recipientes en su interior (c).

El sistema de plantación de las estaquillas y la evaluación de los resultados se realizó de manera similar en todos los experimentos posteriores. Periódicamente se contabilizó el número de estaquillas brotadas, el número de brotes por estaquilla, y la posición de los brotes en la estaquilla (situación del nudo) desde -1 (por debajo de la superficie del sustrato; Fotografía 3.2.6) hasta la parte superior de la estaquilla; la longitud de los brotes se midió con una regla graduada (Fotografía 3.2.7).



Fotografía 3.2.6. Planta de *C. spinosa* sbsp. *rupestris* en la que han brotado las yemas de los nudos situados por debajo de la superficie del sustrato.



Fotografía 3.2.7. Planta de *C. spinosa* sbsp. *rupestris* en el momento de evaluar la longitud de sus brotes con ayuda de una regla graduada.

3.2.4. Análisis estadístico

En todos los ensayos realizados, se analizaron los resultados obtenidos mediante el análisis de la varianza (ANOVA) con el paquete estadístico STATGRAPHICS Centurion XVI (StatPoint Technologies 2013). Cuando un efecto ha resultado significativo ($P < 0,05$), se ha realizado la separación de medias mediante el test LSD ($P < 0,05$). En todos los casos, previo a la realización del análisis de la varianza se ha comprobado que las series de datos siguen una distribución normal, y previo a la realización del análisis de la varianza, los valores porcentuales, han sido transformados mediante la expresión $\text{arc sen } \sqrt{x}$.

3.3. HISTOLOGÍA Y ANATOMÍA DE LOS ÓRGANOS VEGETATIVOS DE *CAPPARIS SPINOSA* L. SUBSP. *RUPESTRIS*

3.3.1. Introducción

Los estudios científicos, que abordan el problema de la reproducción vegetativa de *Capparis* spp. mediante estaquillas, coinciden en la dificultad de su propagación, tanto en desde el punto de vista de la rizogénesis como de la brotación.

La observación visual de la planta de *C. spinosa* subsp. *rupestris* presenta unas características distintas de otras especies vegetales que podrían dar respuesta a algunos interrogantes que plantea su reproducción vegetativa. Por un lado, en cada nudo de los ramos del primer año, hemos observado que solo aparece una flor por nudo o, en su caso, un brote vegetativo o mixto. En ningún caso hemos observado la presencia de más de un brote, ya sea de flor o vegetativo, por nudo. Esta observación, nos plantea la necesidad de realizar estudios histológicos de las yemas de los nudos para confirmar la presencia de una única yema por nudo, descartando así, la presencia de yemas latentes. Por otro lado, los numerosos estudios sobre adaptación de los distintos órganos de la planta de *Capparis* spp. a las condiciones ecológicas extremos, no presentan estudios histológicos de la posible adaptación de las raíces y tallos a estas condiciones.

La relación entre la anatomía del tallo y los factores ambientales es conocida. Los vasos largos y anchos son más eficaces en la conducción de agua, pero también son más vulnerables a las cavitaciones. Los brotes de *Capparis spinosa*, empiezan a crecer a principios de mayo y empiezan a secarse a final de octubre o noviembre en muchas regiones mediterráneas, es decir, crecen durante el verano que es caliente y seco. Las hojas de *Capparis spinosa* son gruesas y anfiestomáticas (Psaras *et al.*, 1996) aportando una ventaja para la capacidad fotosintética de la planta (Peat y Fitter, 1994) y tienen alta conductancia estomática a mediodía y altas tasas de fotosíntesis

durante el periodo seco de verano (Rhizopoulon, 1990; Rhizopoulon *et al.*, 1997). Por otro lado, la alcaparra tiene acceso a un horizonte de agua más o menos estable a través de un sistema radicular profundo y extenso (Rhizopoulon *et al.*, 1997; Psara y Sofroniou, 1999).

Los análisis de las relaciones hídricas de las hojas jóvenes en expansión y completamente expandidas no pueden utilizarse como indicadores de la respuesta de *C. spinosa* a la sequía porque los estomas se sierran antes de alcanzar la turgencia cero (Rhizopoulon, 1990). Las características más destacadas del mecanismo de crecimiento de *C. spinosa* demuestran una sofisticada respuesta de la planta a la sequía, con ajuste osmótico, apertura estomática regulada, propiedades de la pared celular y aumento de la densidad de raíces.

Los factores externos e internos limitan la capacidad de una planta para formar raíces adventicias. La carga genética, competencia celular, reguladores del crecimiento, nutrientes, agua y nivel de carbohidratos, están entre los factores genéticos (Beyl y Trigiano, 2008). Los factores externos que afectan a la formación de raíces adventicias incluyen la luz, aire y temperatura del medio de enraizamiento, humedad del medio de enraizamiento.

Los procesos fisiológicos que se ven afectados cuando se induce la formación de raíces adventicias incluyen la formación de heridas, transpiración, fotosíntesis, respiración, proteínas, carbohidratos y fitohormonas (Beyl y Trigiano, 2008).

3.3.2. Objetivos

Bajo nuestro punto de vista, abordar estudios histológicos que nos permitieran comprender la problemática de la reproducción vegetativa nos parecía fundamental.

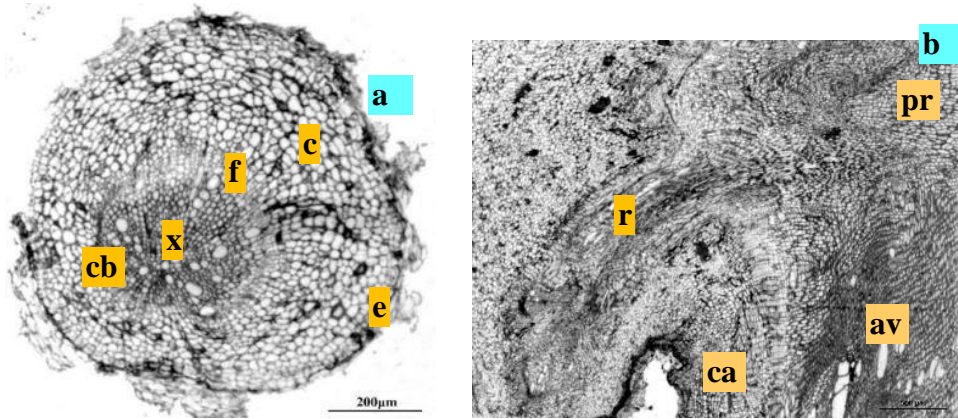
En nuestro caso realizamos estudios histológicos de la zona nodal para confirmar la existencia de una sola yema por nudo y, por otro lado, encontrar posibles mecanismos de adaptación de la anatomía de las distintas partes de la planta a las condiciones de estrés hídrico.

3.3.3. Material y métodos

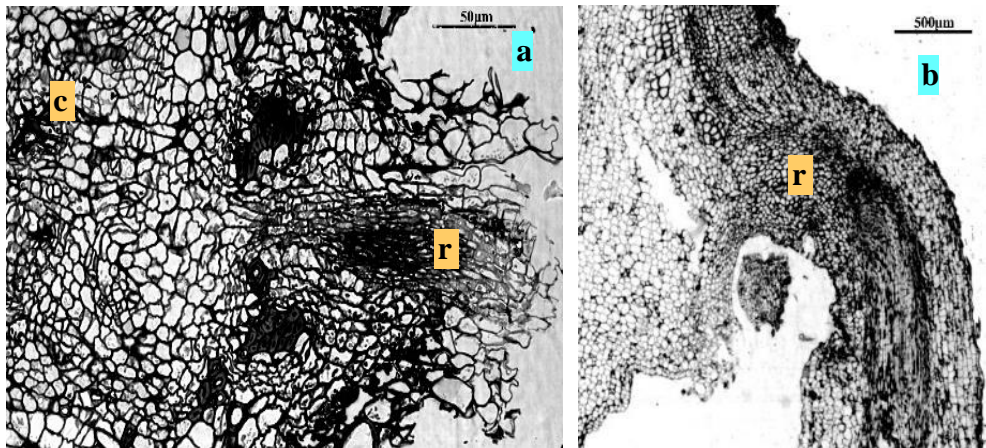
Para la realización de este estudio se ha utilizado un estereomicroscopio Leica modelo MZ APO con cámara fotográfica DFZ420 (Fotografía 2.3.1 a), y un microscopio óptico del Servicio Central de Soporte a la Investigación Experimental (SCSIE) de la Universitat de València, Estudi General. El procedimiento seguido ha sido el descrito en el apartado 2.3.2.

3.3.4. Resultados y discusión

En los tallos que forman la estaquillas pueden observarse unos cambios anatómicos durante la iniciación de las raíces que pueden dividirse en cuatro etapas: desdiferenciación de células maduras específicas; formación de iniciales de raíz en ciertas zonas cercanas a los haces vasculares, las cuales se han vuelto meristemáticas por desdiferenciación; desarrollo subsecuente de estas iniciales de raíz en primordios de raíces organizados (pr; Fotografía 3.3.1 b); desarrollo y emergencia de estos primordios radicales hacia afuera a través del tejido de tallo, más la formación de conexiones vaculares entre los primordios radicales y los tejidos conductores de la propia estaca (r; Fotografía 3.3.1 a y b; 3.3.2: 3.3.3) (Hartmann, 1990; Beyl y Trigiano, 2008).



Fotografía 3.3.1. Corte histológico de sección transversal de una raíz de *C. spinosa* L. subsp. *rupestris* (a) y sección longitudinal de la base de una estaquilla de *C. spinosa* subsp. *rupestris* mostrando un corte longitudinal de raíz adventicia (r) y un primordio de raíz (pr). Epidermis (e). Cortex (c). Cambium (cb). Floema (f). Xilema (x). Callo (ca). Haces vasculares (av).



Fotografía 3.3.2. Corte histológico de sección transversal (a) y longitudinal (b) de una estaquilla de *C. spinosa* L. subsp. *rupestris* mostrando el corte longitudinal de un trozo de raíz adventicia (r). Cambium (c).



Fotografía 3.3.3. Raíces recién formadas en una estaquilla de *Capparis spinosa* subsp. *rupestris*.

En las estacas de tallo en plantas leñosas, como la *C. spinosa* L. subsp. *rupestris*, en las cuales hay una o más capas de xilema y floema secundarios, usualmente la formación de los primordios de raíz se inicia en células parenquimáticas del floema secundario en las proximidades del sistema vascular, siguiendo el modelo de emergencia de las raíces adventicias denominado “formación indirecta de raíces”, en el que se produce la formación del callo, a través de unas divisiones no direccionadas, antes de iniciarse la formación de los primordios de raíz, a través de un modelo organizado (Hartmann *et al.*, 2002). Por lo general, el origen y desarrollo de las raíces adventicias se efectúa en la periferia del núcleo central de tejido vascular, justo fuera del cámbium (Hartmann, 1990).

Las raíces adventicias al salir del tallo han formado una cofia y los tejidos usuales de la raíz. Así como las conexiones vasculares completas con el tallo de que se originan (Fotografía 3.3.1 a) (Hartmann, 1990). En los cortes histológicos de la sección transversal de la base de una estaquilla enraizada (Fotografía 3.3.2; 3.3.2) se observa la formación de una raíz

adventicia en las proximidades del sistema vascular del floema y la conexión de los tejidos conductores (Fotografía 3.3.2 b).

Los cortes histológicos de la sección longitudinal de la base de una estaquilla de tallo (Fotografía 3.3.1 b) presenta una raíz adventicia (r) que emerge de las células suberificadas del callo formadas en la base de la estaquilla; en la misma sección se observa un primordio de raíz (pr). Sin embargo, según Hartmann (1990) la formación del callo y de las raíces son independientes entre sí y cuando ocurren simultáneamente es debido a su dependencia de condiciones internas y ambientales similares (Fotografía 3.3.4).

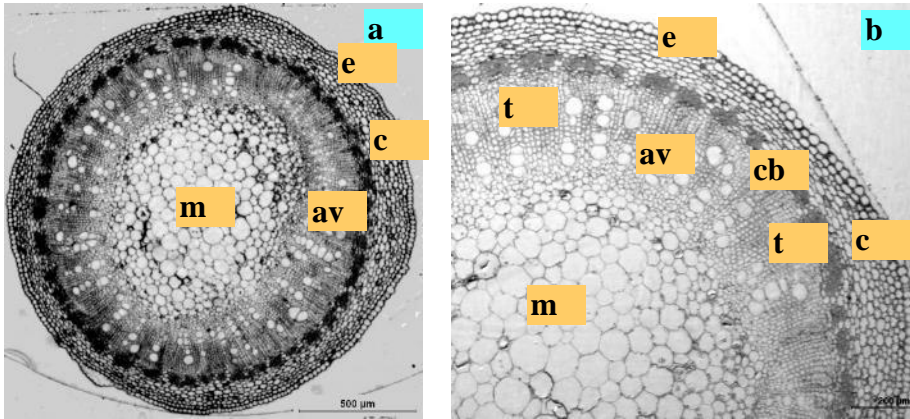


Fotografía 3.3.4. Las raíces salen desde el callo y de un nudo de la estaquilla de *Capparis spinosa* subsp *rupestris*.

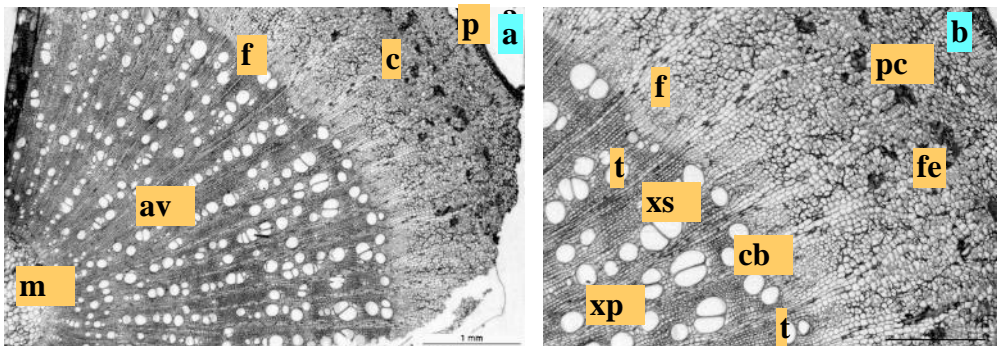
La dificultad en el enraizamiento de estacas, como és el caso de *C. spinosa* subsp. *rupestris*, puede estar relacionado con el desarrollo de un

anillo de esclerénquima continuo entre el floema y la corteza situado al exterior de las raíces adventicias que, a menudo, esta asociado con la maduración de los tejidos de las estaquillas. Este anillo posiblemente constituya una barrera anatómica para el enraizamiento. En estos casos, la reproducción vegetativa con estaquillas con hojas (tallo no lignificada) muestran una proliferación activa de las células de radio del parénquima, resultante en la ruptura de la continuidad del anillo de esclerénquima, con lo cual se hace posible el enraizamiento de estos tallos (Hartmann, 1990).

En los cortes histológicos de la sección transversal de un tallo procedente de la germinación de una semilla (Fotografía 3.3.5 a) y en el detalle de la misma (Fotografía 3.3.5 b) se observan los tejidos típicos de una planta dicotiledónea leñosa: la epidermis, el floema, el cambium, el xilema y la médula, destacando el tamaño de esta última. En la fotografía 3.3.6 se presenta una fracción de la sección de un tallo lignificado (a) y un detalle de la misma (b) en la que se observan de fuera adentro la peridermis, cortex, floema, cambium, xilema y médula, estructuras típicas de una planta leñosa dicotiledónea después del crecimiento secundario. Sin embargo, al compararlo con otras especies leñosas dicotiledóneas presenta un anillo vascular que ocupa la mayor parte del tallo y con tráqueas de gran diámetro que, probablemente estén relacionadas con su adaptación a bajas condiciones hídricas, al permitirle aprovechar mejor los recursos hídricos y acumular agua en sus tejidos. Por otra parte, las tráqueas del anillo vascular de sus raíces también presentan un diámetro muy superior al de otras especies dicotiledóneas (Fotografía 3.3.1 a).



Fotografía 3.3.5. Cortes histológicos de la sección transversal de un tallo de plántula procedente de semilla de *C. spinosa* subsp. *rupestris*. Sección transversal de un tallo (a). Detalle de una sección transversal de un tallo (b). Médula (m). Anillo vascular (av). Tráqueas (t). Epidermis (e). Cámbium (cb).



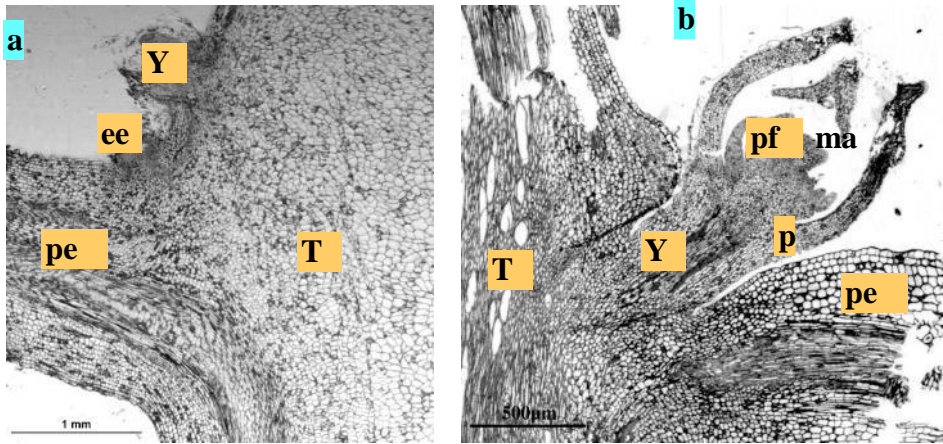
Fotografía 3.3.6. Cortes histológicos de estaquillas de *C. spinosa* subsp. *rupestris*. Sección transversal de una estaquilla de tallo lignificado (a). Detalle de una sección transversal de una estaquilla de tallo lignificado (b). Médula (m). Anillo vascular (av). Tráqueas (t). Peridermis (p). Cámbium (cb). Fibras esclerenquimáticas (fe). Peridermis (p). Floema secundario (fs). Parenquima cortical (pc). Xilema secundario (xp). Xilema primario (xs).



Fotografía 3.3.7. Corte de estaquilla suave de *C. spinosa* subsp. *rupestris* transversal (a) y longitudinal (b). En ambos casos se aprecia un sistema vascular muy desarrollado. Las dos espinas, situadas a ambos lados de la yema, tienen una consistencia herbácea y más o menos recta (a).

Los brotes en crecimiento presentan un meristemo apical (Fotografía 3.3.8 b) en su extremo formado por varias capas de células o túnica que reviste a una masa de células en división o corpus. Los primordios foliares aparecen a medida que el meristemo apical avanza en su desarrollo formando una espiral a su alrededor con una filotaxis 2/5. Los primordios foliares (Fotografía 3.3.9), para dar lugar a las hojas, terminaran por diferenciar el limbo (Fotografía 3.3.10 a) y el peciolo (Fotografía 3.3.11).

En la base de los primordios los primordios foliares, los primordios florales, las yemas axilares y las espinas estipulares, se observan trazas de procambium que los conectan con los cilindros vasculares.



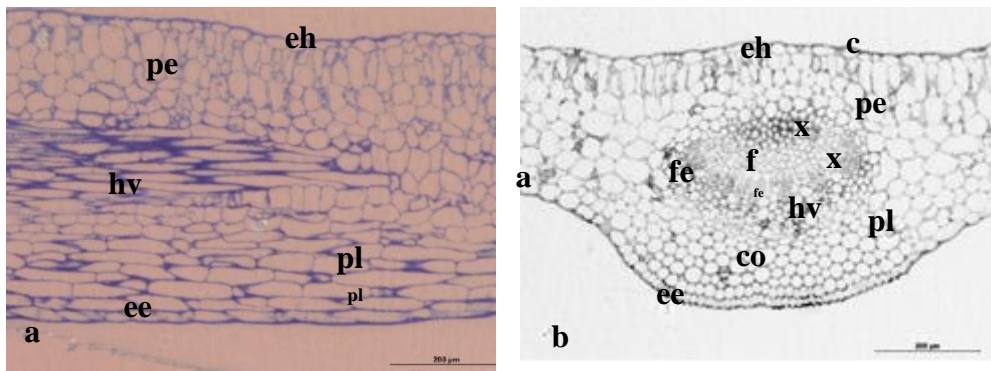
Fotografía 3.3.8. Corte histológico de sección longitudinal de un nudo de una estaquilla de *C. spinosa* L. subsp. *rupestris* mostrando la inserción del peciolo y de una yema axilar (a). Detalle de una yema (b). En ambas fotografías se observa la presencia de una sola yema por nudo. Meristemo apical (ma). Primordios foliares (pf). Prófilos (p). Peciolo (pe). Yema (Y). Espina estipular (ee). Tallo (T).



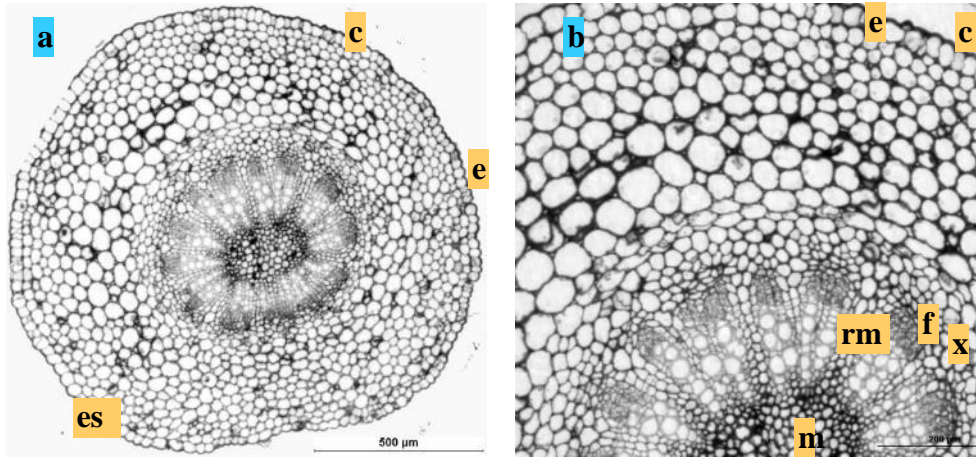
Fotografía 3.3.9. Yema axial de una estaquilla de *C. spinosa* L. subsp. *rupestris*.

En la fotografía 3.3.10 se presenta un corte histológico con la sección transversal del limbo de una hoja (a) y un detalle de una sección transversal del nervio principal de la hoja (b) en la que se observa de fuera adentro la cutícula, epidermis, floema, el cambium, xilema y médula. En el nervio central del limbo de la hoja (Fotografía 3.3.10) se observa (de arriba abajo) la cutícula y la epidermis del haz, parénquima en empalizada, haces vasculares, parénquima lagunar, la epidermis y la cutícula del envés.

Los cortes histológicos del peciolo de las hojas muestran una cutícula y una epidermis muy definida envolviendo a un grueso cortex (Fotografía 3.3.11). Sin embargo, presenta un anillo vascular muy desarrollado, al igual que el observado en el tallo y las raíces, con un diámetro traqueal también superior a los que presentan otras especies dicotiledóneas leñosas. Del mismo modo, presenta una médula gruesa y lignificada que le permite mantener la orientación de la hoja para poder captar la mayor radiación solar, incluso en casos de condiciones ambientales extremas, haciéndola más eficiente.

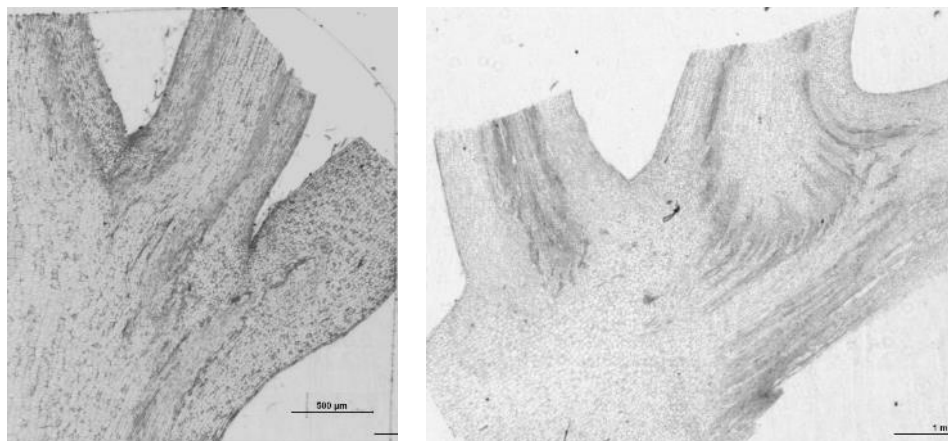


Fotografía 3.3.10. Cortes histológicos del limbo de hojas de *C. spinosa* sbsp. *rupestris*. Sección del limbo de la hoja (a). Sección transversal del nervio principal de la hoja (b). Parenquima en empalizada (pe). Parenquima lagunar (pl). Epidermis del Haz (eh). Epidermis del envés (ee). Haz vascular (hv). Estoma (es). Xilema (x). cutícula (c). Floema (f). Colenquima (co). Fibras de esclerenquima.



Fotografía 3.3.11. Cortes histológicos del peciolo de una hoja de *C. spinosa* sbsp. *rupestris* (a). Detalle del corte del peciolo (b). Epidermis (e). Estoma (es). Cutícula (c). Radios medulares (rm). Floema (f). Xilema (x). Médula (m).

Los numerosos cortes histológicos de las secciones longitudinales de los nudos de las estaquillas, una vez brotada la única yema axial visible (Fotografía 3.3.12), o incluso antes de que brotara (Fotografía 3.3.8 b) nos confirmaron que no existían otras yemas latentes en el nudo y por tanto, la imposibilidad de brotar y dar lugar a estaquillas viables. Por otra parte, cuando tomamos nudos de estaquillas sin brotar y nudos de estaquillas que ya habían brotado y los cultivamos *in vitro* (datos no presentados), los nudos sin brotar, en todos los casos, dieron lugar a un único brote y los nudos que ya habían brotado antes del cultivo *in vitro*, solo enraizaron sin dar lugar a brotes. En nuestro caso, resulta evidente que en cada nudo sólo existe una yema y no se observaron yemas latentes.



Fotografía 3.3.12. Cortes histológicos de secciones longitudinales de nudos de estaquillas de *C. spinosa* L. subsp. *rupestris* mostrando la inserción del peciolo y del pedúnculo de la flor en posición axial. En ambas fotografías se observa la ausencia de yemas, una vez que ha brotado la única yema.

3.3.5. Conclusiones

Los estudios histológicos de los nudos de *C. spinosa* subsp. *rupestris* confirman la existencia de una sola yema por nudo, descartando la presencia de yemas latentes que pudieran dar lugar a nuevos brotes.

Los estudios de secciones de tallos de *C. spinosa* subsp. *ruspestris* muestran unas características anatómicas que favorecen una alta conductividad hidráulica, compatibles con una estrategia adaptativa.

3.4. INFLUENCIA DE *CAPPARIS SPINOSA* L. SUBSP. *RUPESTRIS* Y *CAPPARIS SPINOSA* L. SUBSP. *SPINOSA*, Y DEL ESTADO FENOLÓGICO DE LAS PLANTAS MADRES EN EL PRENDIMIENTO DE LAS ESTAQUILLAS

3.4.1. Introducción

En las últimas décadas, el cultivo de la Alcaparra en España ha sufrido un fuerte retroceso y su explotación con fines comerciales, prácticamente, ha desaparecido. De las casi 5 mil hectáreas en producción que registra el anuario de estadística Agraria (MAPAMA, 2017) en el año 1985, tan sólo quedan unas 20-30 hectáreas en la actualidad. Este fuerte retroceso ha sido consecuencia de muchos factores, entre ellos, la necesidad de mucha mano de obra en el momento de la recolección, entrando en competencia con otros países productores como Marruecos y Turquía, con una mano de obra mucho más barata que España; dificultades en la propagación de las plantas, máxime cuando la producción de estos países, en su mayoría, procede de plantas silvestres y por lo tanto, sin costes de cultivo; la introducción de cultivos más rentables en las zonas donde se cultivaba la alcaparra; y la llegada masiva de turismo en las costas del Mediterráneo, su principal zona de cultivo, que ha provocado un éxodo de la agricultura al sector servicios, mucho más remunerado.

La imposibilidad de mecanizar la recolección de los distintos órganos de la alcaparra está frenando la expansión del cultivo en España. La recolección es operación que absorbe las mayores cantidades de mano de obra, y supone los mayores costes, del cultivo. El crecimiento indeterminado de sus brotes ha imposibilitado las iniciativas de recolección mecanizada, sin embargo, aporta una producción dilatada en el tiempo, desde mayo hasta noviembre. Las poblaciones del continente europeo pueden ser confinadas dentro de una especie, *Capparis spinosa* L. con dos subespecies, subsp. *spinosa* y subsp. *rupestris*. La mayoría de las

plantaciones comerciales realizadas en España, en las últimas décadas, han sido de *C. spinosa* L. Subsp. *spinosa*, que posee dos apéndices transformados en espinas estipulares en forma de gancho de consistencia leñosa (Figura 3.4.1, Fici y Gianguzzi (1997)), que dificultan la recolección en esta subespecie. Sin embargo, *C. spinosa* L. Subsp. *rupestris* posee los apéndices transformados en espinas estipulares con una consistencia herbácea (Figura 3.4.2, Fici y Gianguzzi (1997)) que facilitan la recolección manual de las distintas partes de la planta, abaratando los costes de la operación. Mientras no se puedan mecanizar las labores de recolección en la alcaparra para abaratar los costes, el estudio de aquellas técnicas que faciliten esta operación cultural de forma manual, resultan interesantes.

Otro de los inconvenientes no resueltos, es la propagación de las plantas de alcaparra. La reproducción sexual tiene dos inconvenientes fundamentales, el bajo porcentaje de germinación (menor del 5 % en la mayoría de los casos) y, por otro lado, la diversidad de las alcaparras propagadas por esta técnica. En la actualidad, existen pequeños nichos de mercado que exigen calidad (tipo gourmet), pagando altos precios, pero para ello es necesario seleccionar aquellos clones que tengan productos de mayor calidad y poderlos reproducir con las mismas características. Con la reproducción sexual, no se puede conseguir y tenemos que hacer uso de la reproducción vegetativa. La reproducción vegetativa mediante estaquillas no está exenta de problemas debido a que, en la mayoría de los casos, se obtienen porcentajes de prendimiento inferiores al 20 %. En su mayoría, las publicaciones científicas, otorgan un amplio margen para proceder al estaquillado, en nuestras condiciones climáticas, de enero a abril, sin concretar el estado fenológico óptimo. Para optimizar los resultados de prendimiento, resulta fundamental abordar el estudio del estado fenológico en el momento de proceder al estaquillado.

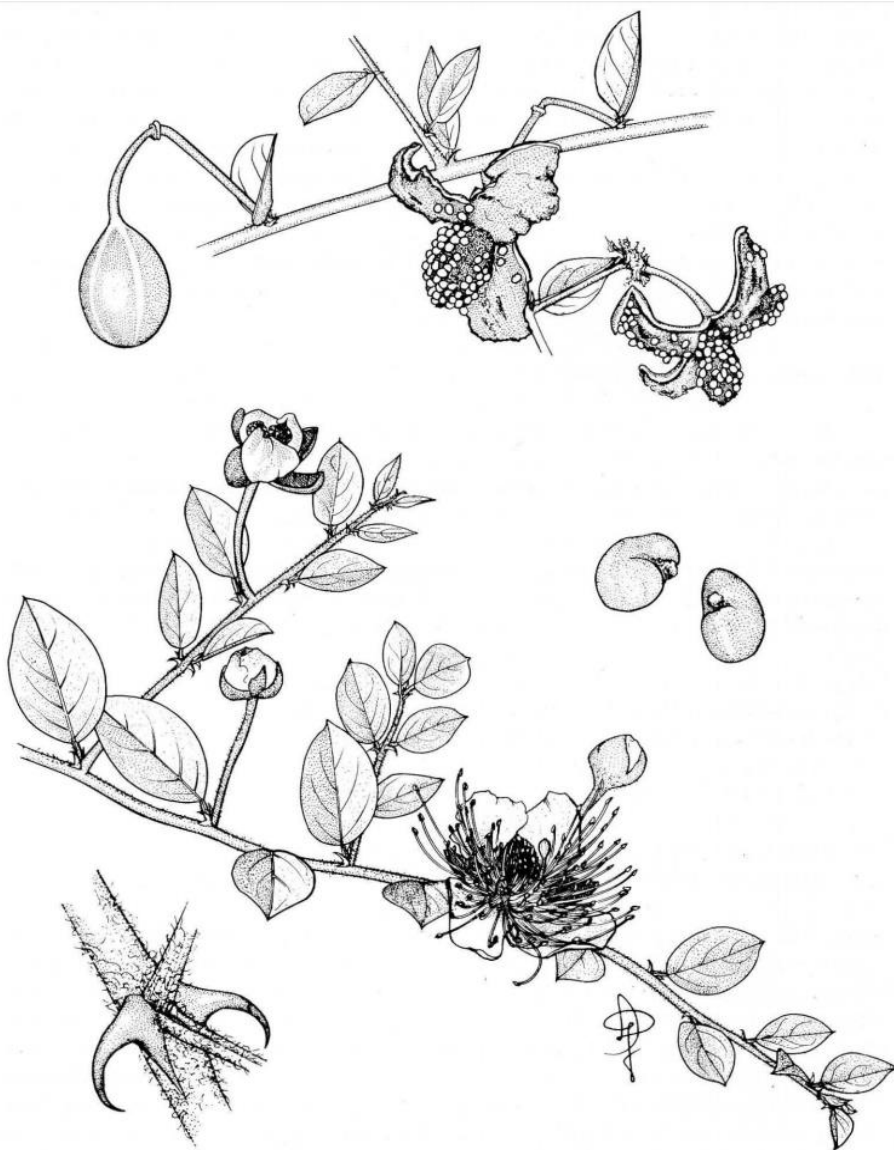


Figura 3.4.1. *Capparis spinosa* subsp. *spinosa*: Tallos con flores y frutos, semillas, estípulas (Fuente: Fici y Gianguzzi (1997)).

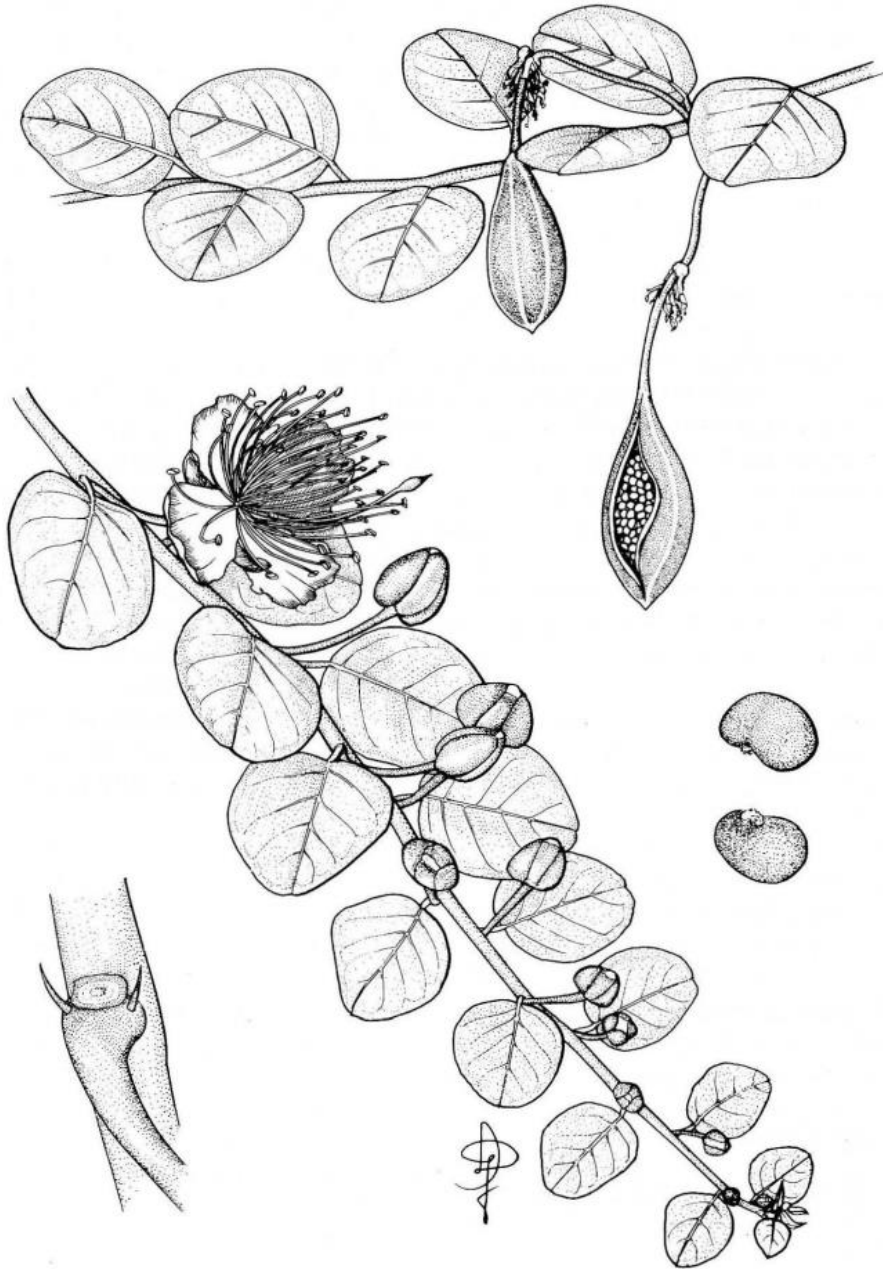


Figura 3.4.2. *Capparis spinosa* subsp. *rupestris*: Tallos con flores y frutos, semillas, estípulas (Fuente: Fici y Gianguzzi (1997).

3.4.2. Objetivos

Estudiar la capacidad de prendimiento (enraizamiento y brotación) de las estaquillas procedentes de *C. spinosa* subsp. *rupestris* con espinas de consistencia herbáceas (no lignificadas) frente a la capacidad de prendimiento de las estaquillas procedentes de *C. spinosa* subsp. *spinosa* con espinas lignificadas que dificultan la recolección, con el fin de poderla sustituir desde el punto de vista de su propagación y disminuir los costes de recolección.

Por otra parte, se estudia el porcentaje de prendimiento de las estaquillas de alcaparra en función del estado fisiológico de las yemas para poder identificar el momento en el cual las estaquillas tienen mayor capacidad de prendimiento.

3.4.3. Material y métodos

En este experimento se compara el comportamiento de material vegetal de dos subespecies, *C. spinosa* subsp. *rupestris* y *C. spinosa* subsp. *spinosa* (Fotografía 3.4.1), la primera (Fotografía 3.4.2) procedente de dos localizaciones, parcela UPV (srV) e Ibiza (srI), y la segunda de la parcela UPV (de plantas obtenidas de estaquillas procedentes de plantas madre de Mallorca; ss). El material vegetal de Ibiza se recolectó el 16 de febrero, en estado fisiológico de yema hinchada, y el de la parcela de la UPV el 17 de febrero, estando la subsp. *rupestris* en estado de parada vegetativa y la subsp. *spinosa* en estado de yema hinchada. El estaquillado se realizó el 17 de febrero, obteniendo estaquillas de 10 cm de longitud y de 4 a 11 mm de diámetro.

El diseño experimental, fue en 6 bloques de repetición con 7 estaquillas por bloque de cada material vegetal ensayado.



Fotografía 3.4.1. Planta de *Capparis spinosa* subsp. *spinosa* en un campo de Llubí (Mallorca).



Fotografía 3.4.2. Estaquillas de la subsp. *rupestris* listas para la plantación.

En total se realizó una plantación de 126 estaquillas. Durante el proceso de enraizamiento, las estaquillas se mantuvieron en condiciones controladas de temperatura y humedad relativa.

Al final del proceso (13 junio) se procedió al arranque de las estaquillas que habían brotado y se comprobó la presencia de raíces, para confirmar el prendimiento de las estaquillas, es decir, que se tenía una nueva planta, con raíz, tallo y hojas.

Para evaluar el vigor de las nuevas plantas, se presenta la evolución del número de brotes por estaquilla y la longitud de los brotes.

Con el fin de obtener una medida indirecta de la deshidratación de las estaquillas en la parte superior de las mismas, se contabilizó la brotación de las estaquillas en función del nudo y se presenta su evolución.

El número de plantas obtenidas por tratamiento (prendimiento) se expresa de forma porcentual teniendo en cuenta las estaquillas que habían brotado y enraizado.

La brotación, expresada en porcentaje de estaquillas brotadas, el número de brotes por estaquillas y la posición de los brotes, se evaluaron en cuatro fechas: 22 de marzo, 7 de abril, 9 de mayo y 13 de junio. Además, en la última fecha se evaluó el prendimiento y la longitud de los brotes.

3.4.4. Resultados y discusión

Los prendimientos en el estaquillado de srI superó el 80 %, mientras que en el material srV apenas alcanzó el 20 % (Figura 3.4.3). Por otro lado, y en concordancia con su estado fenológico, más avanzado, los resultados de prendimiento de las estaquillas de ss estuvieron comprendidos en el intervalo anterior (50%). No obstante, además de la diferencia en el estado fenológico, existe una amplia diferenciación genética entre regiones, aunque

generalmente es débil entre poblaciones dentro de cada región (López *et al.*, 1988).

Las diferencias de prendimiento encontradas entre el material vegetal estudiado, se debieron, probablemente, al diferente estado fisiológico de las yemas de las estaquillas en el momento de la plantación. Las estaquillas de srI en el momento de la plantación habían alcanzado la fase previa a la brotación (yemas hinchadas) y las srV llevaban más de un mes de retraso debido a las condiciones climáticas. Las plantas de alcaparra de Ibiza se encontraban al abrigo de una muralla en la orientación sur y las procedentes de Valencia al abrigo de un edificio de cinco plantas en orientación norte. El estado fisiológico de las estaquillas de ss también se encontraban en un estado fisiológico intermedio respecto a las de Ibiza en el momento de la plantación. Ben Salem *et al.* (2001) obtuvieron mejores resultados de enraizamiento (90 %) con el estaquillado suave de variedades de alcaparra sin espinas que con variedades de alcaparra con espinas (10 %). Kenny (1995), en estudios realizados en *C. spinosa*, atribuyó la gran variabilidad en el prendimiento de las estaquillas al estado fisiológico de las ramas en el momento de la plantación. Por otro lado, López *et al.* (1988) concluyeron que las poblaciones de *C. spinosa* presentan un elevado nivel de variabilidad genética que se explica por ser ésta una especie de amplia distribución, perenne de larga vida, con alta fecundidad, y con fecundación cruzada, características que se sabe están correlacionadas con la variabilidad genética. A pesar de ello, los mismos autores afirman que la acción humana a través del cultivo no parece haber erosionado, al menos de momento, los recursos genéticos de la especie.

El porcentaje de estaquillas brotadas de srI y de ss no presentaron diferencias significativas, alcanzando valores superiores al 90 % en el primer caso. Sin embargo, el porcentaje de brotación de las estaquillas de srV no llegó a superar el 30 % (Figura 3.4.4). A pesar de ello, alrededor del 90 % de las estaquillas de srI que habían brotado dieron lugar a una nueva planta. Sin embargo, las estaquillas de ss tan sólo un 56,8 % de las estaquillas que brotaron pudieron dar lugar a un plantón (Figura 3.4.3 y

3.4.4). Esto podría indicar la mayor capacidad de prendimiento de las estaquillas de las sr frente a la ss.

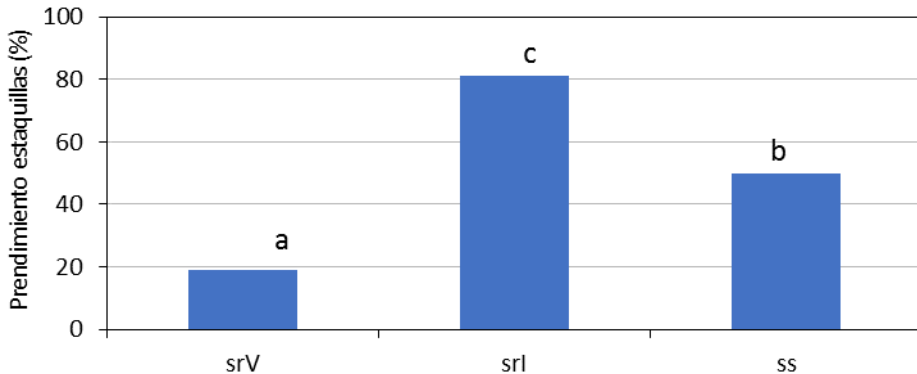


Figura 3.4.3. Prendimiento de las estaquillas de *C. spinosa* de la subsp. *rupestris* (srV y srI) y *spinosa* (ss). Estaquillado: 17 de febrero. Letras diferentes en las columnas indican diferencias significativas. $P \leq 0,05$.

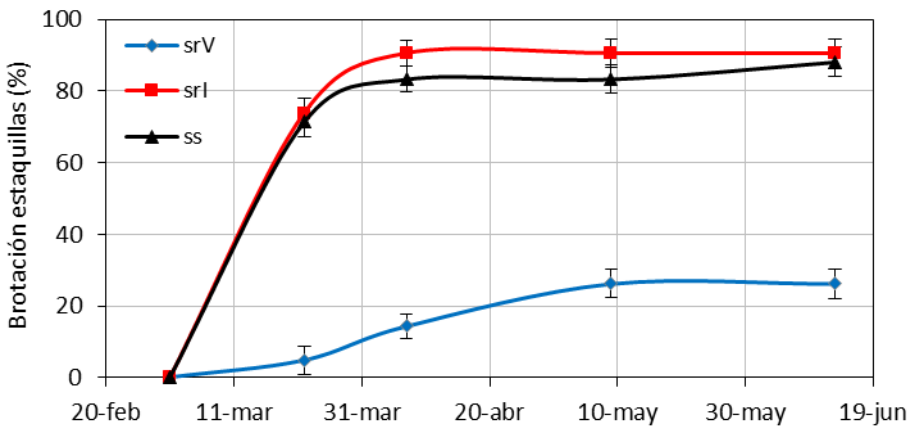


Figura 3.4.4. Evolución de la brotación en estaquillas de *C. spinosa* de las subsp. *rupestris* (srV y srI) y *spinosa* (ss). Estaquillado: 17 de febrero. Las barras de error verticales indican la desviación estándar.

Las estaquillas que se encontraban en el estado fenológico de yema hinchada, indistintamente de la subespecie, a los 30 días de su plantación habían brotado más del 70 %, mientras que en las estaquillas que se encontraban en parada vegetativa en el momento de la plantación ni tan siquiera habían alcanzado el 5 % (Figura 3.4.4).

La ss y la srI dieron lugar al mayor número de brotes por estaquilla, 2,9 y 3,1 respectivamente (Figura 3.4.5). En ambos casos el material vegetal se encontraba en un estado fenológico cercano a la brotación (yema hinchada) y esto permitió que las estaquillas brotaran antes de que se secaran y de una forma más intensa que en el caso de las srV, que en el momento del estaquillado se encontraba en completa parada invernal.

La ss brotó antes que la sr como se comprobó en la primera fecha de evaluación (22 de marzo), donde el número de brotes fue del orden del 35 % superior. Sin embargo, en la ss al brotar prematuramente se consumieron las reservas de la estaquilla antes de que se produjera el enraizamiento y como consecuencia se secaron los nuevos brotes. En efecto, la pérdida de brotes durante los tres meses posteriores a la primera evaluación (22 de marzo) fue superior al 55 %. Resultados similares (48%) fueron encontrados en la srI con la salvedad que dicha pérdida empezó un mes después debido al retraso en la brotación. En cambio, la misma subespecie procedente de Valencia perdió un 35 % de los brotes durante el siguiente mes a la primera evaluación y después el número de brotes se mantuvo prácticamente constante (Figura 3.4.5). Los estudios realizados por Ghorbel *et al.* (2001) llegaron a la conclusión de que la alcaparra con espinas fue mucho más difícil de enraizar que la *C. spinosa* subsp. *inermis*.

La mayor longitud de los brotes (y por tanto vigor; Figura 3.4.6) se encontró en la ss (5,9 cm) frente a la sr (3,1 y 4,4 cm). En las sr la longitud de los brotes fue mayor cuando el material vegetal se estaquilló inmediatamente antes de la brotación (Ibiza) en comparación con el procedente de estaquillas en parada vegetativa (Valencia).

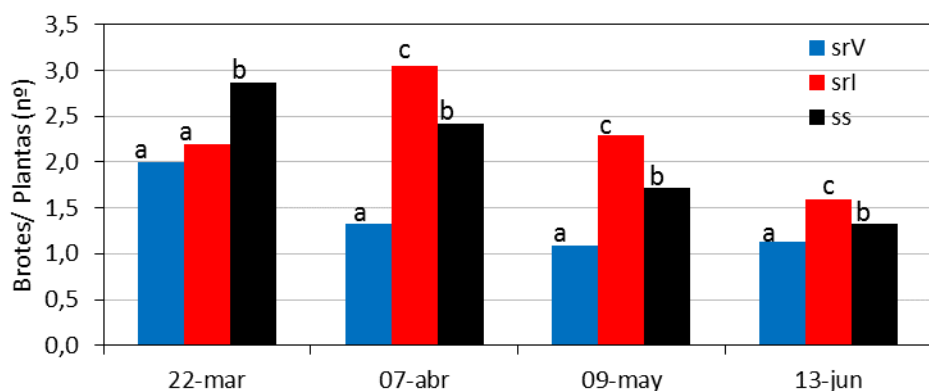


Figura 3.4.5. Evolución de la aparición y permanencia de los brotes por estaquillas de *C. spinosa* de las subsp. *rupestris* (srV y srl) y *spinosa* (ss). Estaquillado: 17 de febrero. Letras diferentes en cada grupo de columnas indican diferencias significativas. $P \leq 0,05$.

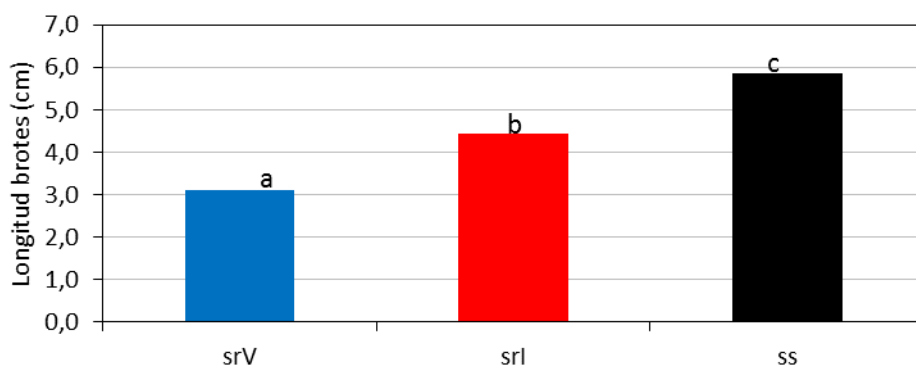


Figura 3.4.6. Longitud de los brotes en estaquillas de *C. spinosa* de las subsp. *rupestris* (srV y srl) y *spinosa* (ss). Estaquillado: 17 de febrero. Letras diferentes en las columnas indican diferencias significativas. $P \leq 0,05$.

En las estaquillas procedentes de plantas que en el momento del estaquillado se encontraban en parada vegetativa tardaron más en brotar (Figura 3.4.4) y como consecuencia se fue secando la parte superior y únicamente quedaron en condiciones de brotar los nudos enterrados y cercanos a la superficie del sustrato. En efecto, en los nudos apicales de la estaquilla, 5 y 6, no brotó ninguno. Es más, considerando en conjunto el primer nudo sobre la superficie del sustrato y el primero por debajo de la misma representan más del 60 % de la brotación, siendo el primer nudo sobre la superficie del sustrato el más brotado, con valores cercanos al 40 % (Figura 3.4.7). Sin embargo, cuando el material vegetal procedía de plantas próximas a su brotación, la mayoría de las estaquillas brotaron antes de deshidratarse en su parte apical. Prueba de ello es la brotación obtenida en los nudos 5 y 6 por encima de la superficie del suelo y, que los nudos por debajo de la superficie del sustrato brotaron en un bajo porcentaje (7,4 %) debido a la inhibición que ejercían los nudos superiores que, entre los tres primeros, superaron el 75 % del total de la brotación.

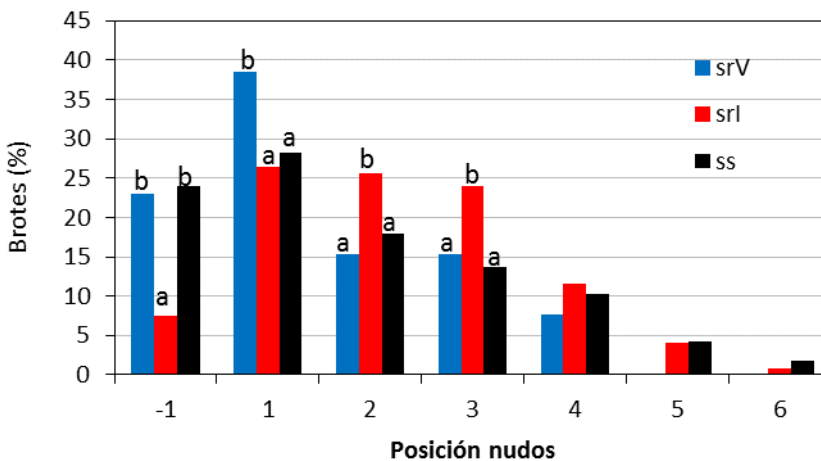


Figura 3.4.7. Posición de los brotes en la estaquilla (nudo) de *C. spinosa* de la subsp. *rupestris* (srV y srI) y *spinosa* (ss). Estaquillado: 17 de febrero. Letras diferentes en cada grupo columnas indican diferencias significativas. $P \leq 0,05$.

La brotación de la ss se asemejó a la obtenida en el material vegetal procedente de Ibiza, que en ambos casos estaba a punto brotar. No obstante, aunque la brotación de los nudos 5 y 6 fue similar, la brotación del nudo enterrado de la ss fue superior (23,9 %) al secarse el extremo apical de algunas estaquillas (Figura 3.4.7).

3.4.5. Conclusiones

Las estaquillas leñosas en estado fenológico de yema hinchada de *C. spinosa* subsp. *rupestris* tuvieron un mayor prendimiento que las de *C. spinosa* subsp. *spinosa* por lo que, desde el punto de vista de la propagación, no hay ningún inconveniente en sustituirla por la subsp. *rupestris*.

Con el retraso de la realización del estaquillado del material vegetal hasta el estado de yema hinchada, se mejora el prendimiento.

3.5. EFECTO DE LA POSICIÓN DE LA ESTAQUILLA DENTRO DE LA RAMA DE *CAPPARIS SPINOSA* SUBPS. *RUPESTRIS* SOBRE LA BROTAÇÃO

3.5.1. Introducción

La poda de las ramas a pocos centímetros de la base es una técnica ampliamente conocida por los agricultores que se dedican al cultivo de la alcaparra. Los brotes que se desarrollan a partir de estas yemas basales son más vigorosos al reducir su competencia con otros brotes.

Los estudios que hacen referencia a las dificultades de enraizamiento de las estaquillas de alcaparra son numerosos (Söyler y Arslan, 2000, k *et al.*, 2002). Söyler y Arslan (2000) tratando las estaquillas de *C. spinosa* con 500 mg L⁻¹ de AIA en abril y 250 mg L⁻¹ de AIB en mayo durante 12 h, obtuvieron prendimientos del 28 % y 29 %, respectivamente. Sin embargo, no existen estudios sobre el comportamiento reproductivo de las yemas, desde el punto de vista de la propagación vegetal en función de su posición a lo largo de la rama. En *C. spinosa* subsp. *rupestris* durante el periodo de reposo vegetativo las ramas empiezan a deshidratarse empezando por su zona apical y avanzando hasta las yemas no brotadas de la zona basal. En algunas ramas, la yema apical de alguna rama sigue activa y la ésta no se deshidrata, pudiendo dar origen a nuevas brotaciones desde su zona apical el próximo año.

La reproducción vegetativa a base de estaquillas, cuando la rama de *C. spinosa* subsp. *rupestris* está en reposo vegetativo, solo se pueden obtener yemas de su parte basal y central. La parte apical de la rama está completamente deshidratada.

3.5.2. Objetivos

Estudiar la capacidad de propagación de las estaquillas basales y centrales de las ramas de *C. spinosa* L. subsp. *rupestris*.

3.5.3. Material y métodos

Para realizar este estudio, se usó material vegetal procedente de Isla de Ibiza y de la parcela de la UPV. El estudio se dividió en dos experimentos. En el primero, la planta se encontraba en la fase final del periodo de reposo de su ciclo vital (mes de marzo), de modo que las estaquillas fueron duras (lignificadas). En el segundo la planta se encontraba en la fase de floración (julio), de modo que las estaquillas fueron semiduras (habían perdido su consistencia suave).

Las estaquillas fueron clasificadas en función de la posición que ocupaban en la rama de la planta madre, diferenciándose dos tipos de estaquillas, basales y centrales. La parte apical de la rama no pudo compararse porque en el mes de marzo, cuando se realizó uno de los experimentos, estaban completamente deshidratadas:

- Basales: estaquillas procedentes de los diez primeros centímetros de la rama de la planta madre.
- Centrales: estaquillas procedentes del tercio central de la rama de la planta madre.

En total se plantaron 112 estaquillas (16 bloques con 7 estaquillas cada uno) procedentes de la zona basal y 112 (16 bloques con 7 estaquillas cada uno) procedentes de la zona central (Fotografía 3.5.1).

En el segundo experimento también se usó material vegetal de *C. spinosa* subsp. *rupestris* pero, en este caso, solo procedía de la parcela de la

UPV. Se plantaron 112 estaquillas, 56 procedentes de la zona basal de la rama y 56 procedentes de la zona central. A aquellas que procedían de la zona central, se les dejó media hoja en el último nudo de la estaquilla. La fecha de plantación fue el 22 de julio y posteriormente se realizaron medidas de brotación y enraizamiento.

Una vez plantadas en el invernadero, se realizaron medidas periódicas con una frecuencia mensual. En estas se estudió la brotación y la posición del nudo en la que brotaban dentro de la estaquilla (Fotografía 3.5.2).



Fotografía 3.5.1. Vista del diseño experimental.

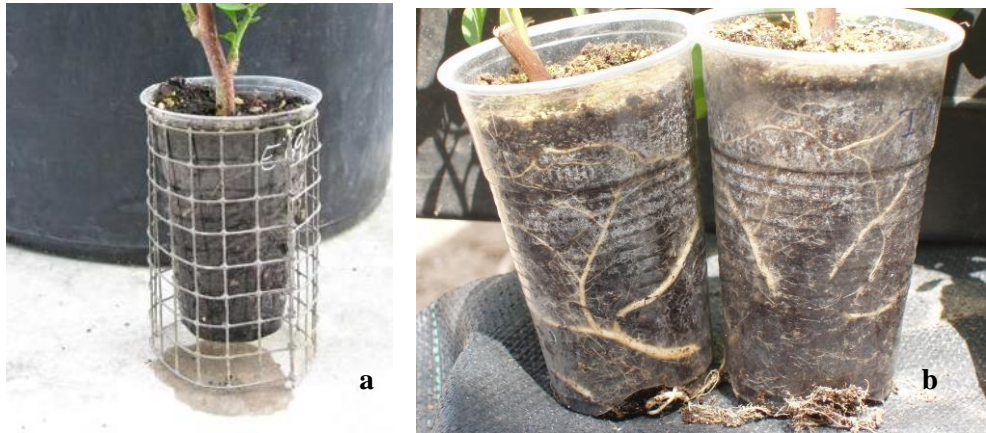


Fotografía 3.5.2. Estaquillas de *Capparis spinosa* brotadas.

Para estimar el grado de enraizamiento se utilizó un cilindro, realizado con tela metálica cuadrículada (con cuadrados de 1 cm de lado) y del mismo diámetro que los contenedores empleados. Se contaron los cuadros en los que había raíces, en la parte lateral, expresándose el grado de enraizamiento en porcentaje de cuadros ocupados por raíces respecto al total de cuadros existentes (Fotografía 3.5.3).

La brotación se expresó en porcentaje. Todas las estaquillas que habían brotado fueron contabilizadas y se obtuvo el porcentaje, tanto de las que procedían de la zona basal como de las que lo hacían de la zona central.

En el caso de los brotes, se contó su número y se midió su longitud. Se anotó la posición del brote en relación a cada nudo de la planta. Para realizar esta medición se consideró que el nudo -1 era el que estaba por debajo de la superficie del sustrato en la maceta y el nudo 1 era el primer nudo por encima de la misma superficie. Sucesivamente se encuentra el segundo, tercero, cuarto y quinto por encima de la superficie. Una vez todos los brotes medidos, se calculó el porcentaje de brotes que había en cada posición.



Fotografía 3.5.3. Cilindro metálico cuadrado empleado para la estimación del grado de enraizamiento (a). Detalle del grado de enraizamiento de las estacas (b).

3.5.4. Resultados y discusión

Los niveles de brotación de todos los experimentos realizados con estacas duras procedentes de la zona central de la rama fueron nulos o prácticamente nulos. La explicación a estos resultados se encontró al observar que a partir de un determinado número de nudos contados desde la base de la rama (aproximadamente 20), en la mayoría de los casos aparecía una flor o un brote mixto y en contadas ocasiones alguna yema se quedaba latente (Fotografía 3.5.4). Los estudios histológicos (Apartado 3.3) de estos nudos, confirman que en cada nudo la yema es única y una vez ha brotado, hace imposible que los esquejes (tomados de la zona donde se encuentran estos nudos) puedan brotar. Solamente en los casos excepcionales, en los que algunas yemas se quedaron en latencia, probablemente influida por las condiciones ambientales, brotaron dando lugar a estos bajos (prácticamente nulos) resultados de prendimiento. Esto confirmó que los esquejes tomados de ramas, en los que la única yema que presentan los nudos había brotado,

no podían dar lugar a una nueva planta, al no quedar yemas latentes ni generarse yemas adventicias.

La particularidad de que la yema es única en cada nudo en *C. spinosa* (L.), explica las diferencias encontradas por otros autores en experimentos similares (aunque el material vegetal fuera de otro género y especie vegetal). En ensayos, similares, realizados con *Milicia excelsa* Welw. por Lin *et al.* (1997) encontraron buenos resultados de prendimiento tanto en las estaquillas de la base de la planta madre como en las centrales. Al-Sagri y Alderson (1996) tomaron estaquillas de *Rosa centifolia* de tres partes diferentes del tallo (apical, media y basal) y las trataron con AIB 3500 mg L⁻¹ en solución 0.03 % de hidróxido potásico. Los mejores resultados de enraizamiento los encontraron en las estaquillas procedentes de la parte media y basal del tallo. Lebrun *et al.* (1998) estudiaron la influencia del tipo de estaquilla y la época de enraizamiento en estaquillas de *Syzygium paniculatum* Gaerth, concluyendo que el grado de enraizamiento obtenido resulta marcadamente superior para esquejes de tipo basal y central.

Los mejores resultados, en cuanto a brotación de las estaquillas duras tomadas de la zona basal de la rama de *C. spinosa*, se obtuvieron con las procedentes de las murallas de la ciudad de Ibiza. En la Figura 3.5.1 a, se observa que a las tres semanas habían brotado más del 50% de las estaquillas y a las siete semanas la brotación había alcanzado niveles superiores al 90 %, para llegar prácticamente al 100 % a las doce semanas. En otro experimento con material vegetal procedente de la Isla de Ibiza (Figura 3.5.1 b), se tuvo que esperar a la séptima semana para alcanzar porcentajes de brotación superiores al 70 % y a la duodécima semana para llegar a al 85 %.



Fotografía 3.5.4. Parte terminal de brotes en los que se observan todas las yemas brotado en forma de flor solitaria (a), excepto una de ellas, que lo ha hecho en forma de brote mixto (b).

La evolución de la brotación del material vegetal de *C. spinosa* (L.) procedente de la parcela experimental de la UPV tuvo un comportamiento similar en todos los experimentos realizados, no obstante, los porcentajes de brotación fueron inferiores al material vegetal procedente de Ibiza. En las figuras c, d y e, se observa que a la tercera semana los niveles de brotación no habían alcanzado el 15 % y que se tuvo que esperar hasta la décimo tercera semana para alcanzar la brotación máxima.

En efecto, las yemas procedentes de la zona basal de la rama permanecieron en latencia y los esquejes obtenidos a partir de estas yemas estuvieron en condiciones de brotar. En todo caso, teniendo en cuenta que los ensayos se llevaron a cabo bajo las mismas condiciones ambientales, es de suponer que las diferencias obtenidas se han debido a las características del material vegetal. En nuestro caso, la procedencia del material vegetal y/o estado fisiológico en el que se encontraba el material vegetal, fue decisiva para obtener buenos resultados de prendimiento. Las estaquillas procedentes de plantas madre silvestres (no cultivadas y procedentes de las murallas y zonas rocosas de la ciudad de Ibiza), con menor ramificación y menor vigor, tuvieron mayores porcentajes de prendimiento. Los esquejes procedentes de plantas madre cultivadas (parcela UPV) con mayor ramificación y vigor, en donde las propias ramas se sombrearon unas a otras, los prendimientos fueron menores. En todo caso, estos trabajos mejoran los resultados obtenidos por Tansi (1999) cuando realizó experimentos con estaquillas de alcaparra obtenidas en tres épocas diferentes (marzo de 1997, junio de 1997 y primavera de 1998) y las sometió a diferentes tratamientos con AIB y AA a concentraciones de 1500-3000 mg L⁻¹ durante 15 segundos. Las estaquillas plantadas en marzo y junio de 1997 no llegaron a enraizar, aunque brotaran. De las plantadas en primavera de 1998 y tratadas con AIB a 1500 mg L⁻¹, enraizó una sola estaquilla. Los resultados de Tansi (1999), probablemente, se podrían explicar si se conociera con detalle la posición del material vegetal en las ramas de las plantas madre.

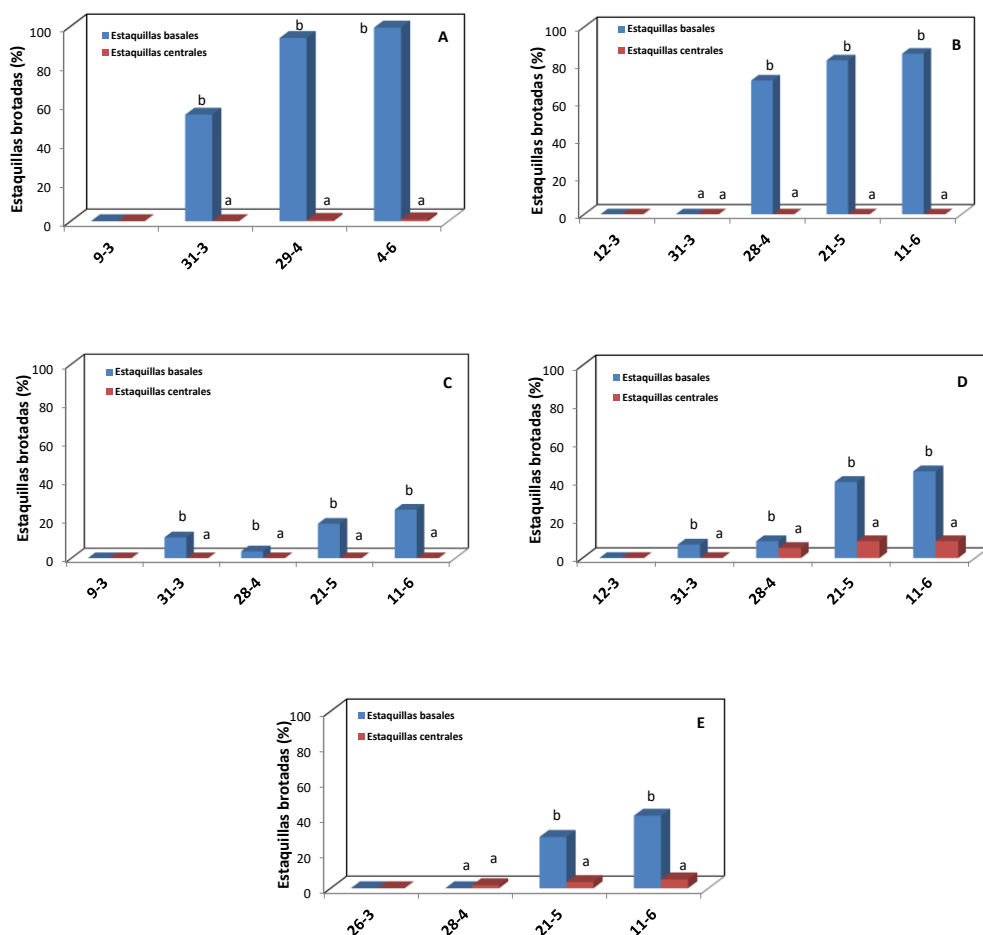


Figura 3.5.1. Evolución de la brotación de las estaquillas duras (%) en función de su posición dentro de la rama. (A y B) Material vegetal procedente de la Isla de Ibiza. (C, D y E) Material vegetal procedente de Valencia. La primera de las fechas corresponde al momento de la plantación. Letras diferentes en cada grupo de columnas indican diferencias significativas, $P \leq 0.05$.

El comportamiento del material vegetal procedente de estaquillas semiduras fue diferente. La totalidad de las estaquillas centrales, en las que se deja y permanece la mitad de la hoja del último nudo, tienen la capacidad de enraizar (Fotografía 3.5.5). En nuestro caso, el 55,3 % perdieron la hoja y no enraizaron. Sin embargo, la brotación fue prácticamente nula (Figura 3.5.2). En todo caso (como ocurrió con las estaquillas duras) aquellas que su yema ya había dado lugar a una flor o brote mixto no pudieron brotar y las pocas estaquillas que presentaron yemas latentes, dieron lugar a una nueva planta.

La capacidad de enraizamiento de las estaquillas centrales de madera semidura va ligada a la permanencia de hojas o parte de la hoja. Ramenani *et al.* (2008), trabajando con *C. spinosa* L., observaron diferencias significativas entre estaquillas con hojas y sin hojas en la capacidad de rizogénesis. Las estaquillas con hojas, cuando fueron tratadas con 6000 y 9000 mg L⁻¹ de AIB, mostraron el mayor porcentaje de rizogénesis. Sin embargo, no encontraron diferencias significativas en el porcentaje de prendimiento entre las estaquillas con hojas y sin hojas. Moalemi y Chahrazi (2004) investigando con *Bougainvillea spectabilis* encontraron la existencia de una correlación positiva entre el porcentaje de rizogénesis y el número de hojas de las estaquillas. Khoshkhui (1996) llegó a la misma conclusión en sus estudios en *Pyrus comunis* var. Home Old cuando las estaquillas con hojas tratadas con AIB (4000 mg L⁻¹) tenían más raíces adventicias que las estaquillas sin hojas tratadas con el mismo regulador del crecimiento. El número de raíces por estaquilla fue mayor en estaquillas tratadas con AIB (6000 y 9000 mg L⁻¹) que cuando se trataron con ANA (Ramenani *et al.*, 2008). Sin embargo, la longitud de las raíces aumentó significativamente en las estaquillas tratadas con estos dos reguladores al compararlas con la longitud de las estaquillas control sin aplicación hormonal. Al-Sagri y Alderson (1996) trabajando con *Rosa centifolia* demostraron que el efecto del AIB sobre la longitud de la raíz depende de la cantidad de raíces.

Las estaquillas procedentes de maderas duras, al tratarse de una especie caducifolia, han perdido todas sus hojas en el momento de la

plantación. De acuerdo con Hartmann *et al.* (1990) las hojas, seguramente, fueron generadoras de sustancias hormonales que controlan la aparición de raíces y/o carbohidratos responsables el crecimiento de dichas raíces.



Fotografía 3.5.5. Estaquilla semidura de *Capparis spinosa* subsp. *rupestris* procedente del centro de la rama. Se aprecian gran cantidad de raíces, sin embargo, la estaquilla no puede brotar porque ha consumido todas sus yemas

Estos resultados coinciden con los obtenidos por Imbernón (2000), al no encontrar diferencias entre la sección basal y la central en cuanto a enraizamiento. Zarza (2003) constata el buen enraizamiento en la primera quincena de julio en la sección apical y moderado en la sección central,

mientras que en noviembre obtuvo porcentajes de brotación y enraizamientos notables en la sección basal (entre 51 y 66 %), similares a los obtenidos por Salem *et al.* (2001) (con valores de enraizamiento comprendidos entre el 50 y 70 % en esquejes plantados entre julio y octubre). La gran variabilidad, en cuanto a prendimiento, encontrada entre los diferentes autores en las estaquillas centrales y apicales puede ser explicada con nuestros resultados (por la falta de yemas latentes en los esquejes). Sospedra (2005) determinó que, en los estaquillados de alcaparra realizados en épocas estivales, el grado de enraizamiento alcanzado fue elevado pero el nivel de brotación se consideró testimonial.

La gran variabilidad (en cuanto a prendimiento de los esquejes) atribuida al diferente estado fisiológico de las ramas según Kenny (1995), se debería, según nuestros estudios, al tipo de yemas presente en cada tipo de estaquilla en el momento de la plantación.

El comportamiento, en cuanto a brotación, de las estaquillas semiduras procedentes de la zona basal (Figura 3.5.2) tuvo un comportamiento similar a las estaquillas basales duras (Figura 3.5.1).

Al considerar los nudos, la capacidad de brotación de la estaquilla fue mayor en los primeros. En efecto, el primer nudo por debajo de la superficie del suelo tuvo una mayor capacidad de brotación en 3 de los 5 experimentos. En todos los casos, a partir del tercer nudo, la brotación disminuyó por debajo del 20 % (Figura 3.5.3). La parte superior de las estaquillas comenzó a deshidratarse, llegando a secarse gran parte de la superficie por encima del suelo. Cuanto más tiempo tardaron en brotar las estaquillas, mayor longitud de las estaquillas se deshidrató y menor fue el rango del nudo brotado. En los casos en los que se secó toda la parte de la estaquilla por encima del suelo, brotó el primer nudo por debajo de la superficie del suelo (Fotografía 3.5.6).

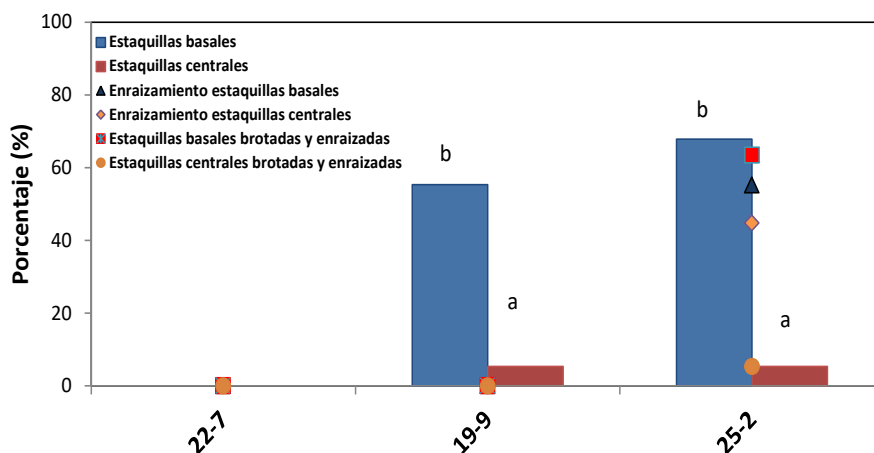


Figura 3.5.2. Evolución de la brotación y enraizamiento (%) de estaquillas semiduras en función de su posición dentro de la rama. La primera de las fechas corresponde al momento de la plantación. Letras diferentes en cada grupo de columnas indican diferencias significativas, $P \leq 0.05$.



Fotografía 3.5.6. Planta de alcaparra. En la que se observa el primer nudo por debajo de la superficie del sustrato y el primero por encima de la superficie del suelo brotados.

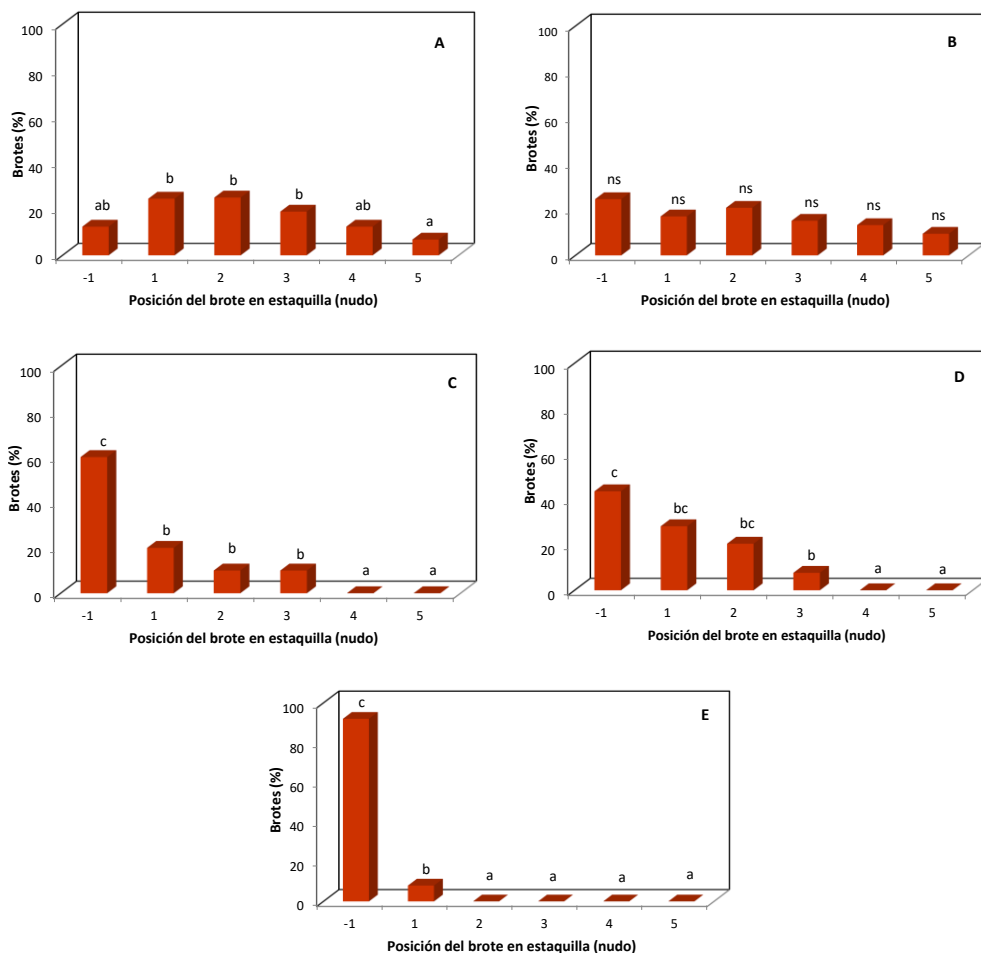


Figura 3.5.3. Evolución de los brotes de las estaquillas duras (%) en función de su posición dentro de la estaquilla. (A y B) Material vegetal procedente de la Isla de Ibiza. (C, D y E) Material vegetal procedente de Valencia. Letras diferentes en las columnas indican diferencias significativas, $P \leq 0.05$.

3.5.5. Conclusiones

La propagación vegetativa de *C. spinosa* subsp. *rupestris* con estaquillas duras (lignificadas) o semiduras (poco lignificadas) presenta un comportamiento similar con estaquillas tomadas en la posición basal de la rama. Cuando se realiza el estaquillado en la época más próxima a su brotación (marzo en las condiciones climáticas de Valencia), pueden alcanzarse prendimientos cercanos al 100 %.

Los nudos de las ramas de *C. spinosa* subsp. *rupestris* solamente poseen una única yema y ésta puede dar lugar a una única flor, un brote mixto (hojas y flores) o brote vegetativo (hojas) cuando la yema brota dentro del mismo año o, cuando se queda latente hasta el año siguiente, a un brote mixto o brote vegetativo por nudo.

Al comienzo de la brotación, las yemas de los primeros nudos de las ramas de *C. spinosa* subsp. *rupestris* permanecen latentes. A partir de un número determinado de nudos contados a partir de la base de las ramas, la totalidad de sus yemas dan lugar a una flor o a un brote mixto y, solamente en contadas excepciones se quedan latentes.

En *C. spinosa* subsp. *rupestris*, las estaquillas tomadas a partir de un determinado número de nudos contados a partir de la base, como han consumido la única yema existente, no pueden brotar y hacen inviable su propagación vegetativa por estaquilla. Únicamente las yemas de las estaquillas, que de forma excepcional no han brotado en el momento del estaquillado hacen posible el prendimiento de las estaquillas.

3.6. EFECTO DEL DIÁMETRO DE LAS ESTAQUILLAS DURAS SOBRE LA BROTACIÓN Y EL PRENDIMIENTO

3.6.1. Introducción

Las ramas de *C. spinosa* L. subsp. *rupestris*, al final del periodo vegetativo se agostan a medida que van perdiendo las hojas y transportan sus reservas hacia las partes basales de la rama y el resto de la planta. Al final del periodo de reposo, la parte terminal de la rama aparece completamente seca.

La mayoría de los autores de trabajos científicos recomiendan reproducir estaquillas mayores de 1 cm de diámetro y longitud de 8 centímetros con 6-10 nudos (Güteryüz *et al.*, 2009). Sin embargo, la gran mayoría de las ramas de esta subsp. *rupestris* tiene diámetros inferiores a 1 cm.

3.6.2. Objetivos

Estudiar la influencia del diámetro de las estaquillas sobre el prendimiento en el momento del estaquillado.

3.6.3. Material y métodos

Este experimento fue realizado en su totalidad con estaquillas duras plantadas en el mes de marzo. Al igual que en el experimento anterior, se usó material vegetal *C. spinosa* subsp. *rupestris* procedente de Ibiza y de la parcela de la UPV.

En este caso solo se utilizaron estaquillas procedentes de la parte basal de la rama para realizar el experimento. Antes de su plantación se midieron los diámetros de las estaquillas, variando entre 4 y 9 mm. Se agruparon en lotes de 14 estaquillas para cada intervalo (4-5, 5-6, 6-7, 7-8, 8-9). Las estaquillas se distribuyeron al azar en 3 bandejas (12 repeticiones con 7 estaquillas por repetición).

Durante los 4 meses posteriores a su plantación se tomaron datos del prendimiento.

3.6.4. Resultados y discusión

El diámetro de las estaquillas duras influyó sobre su prendimiento. Las estaquillas cuyos diámetros no alcanzaban los 4 mm no prendieron (datos no presentados). A medida que aumentaba el diámetro, entre 4 y 6 mm, se obtuvieron mejores resultados de prendimiento. Los mejores resultados se encontraron en estaquillas con diámetros superiores a 6 mm, con prendimientos entre el 50 % y el 100 % (Figura 3.6.1). La mayor cantidad de reservas (presentes en las estaquillas de mayor grosor) y la mayor cantidad de agua acumulada, hicieron que las estaquillas se deshidrataran más lentamente y tuvieran más tiempo para brotar. Una vez empezaron a brotar, ésta fue más vigorosa en los esquejes de mayor tamaño.

A partir de un mínimo, los esquejes de diámetros pequeños enraízan, en algunos casos, mejor que los grandes. López *et al.* (2004), empleando brotes terminales de 1 o 2 mm de diámetro y esquejes leñosos de 7,5 a 15 mm de diámetro, de tomillo rojo, contrastó que la rizogénesis está notablemente influida por la parte de la planta empleada, siendo el porcentaje de enraizamiento de brotes apicales muy superior al de los esquejes leñosos.

Los ensayos con *C. spinosa* subsp. *rupestris* demuestran que no es necesario que las estaquillas alcancen los 15 mm de diámetro, que

recomienda Barbera (1984) en *C. spinosa* L., para obtener buenos resultados de enraizamiento. En lo que sí coinciden es en que, tienen que ser de la base, aunque como se ha explicado en el apartado anterior, no por una razón de diámetro sino porque en la base permanecen las yemas latentes.

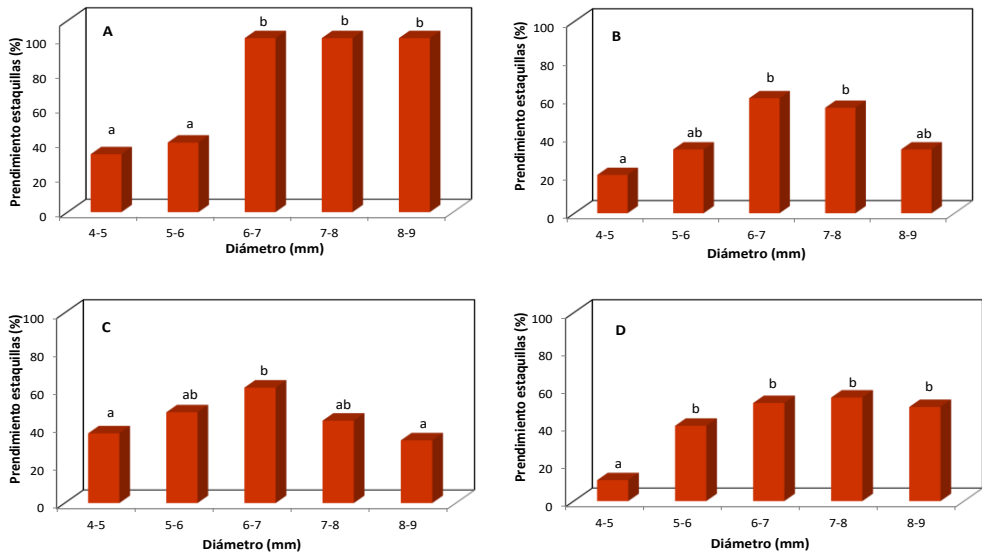


Figura 3.6.1. Evolución del prendimiento de las estaquillas duras (%) en función de su diámetro. (A) Material vegetal procedente de la Isla de Ibiza. (B, C y D) Material vegetal procedente de Valencia. Letras diferentes en las columnas indican diferencias significativas, $P \leq 0.05$.

El grosor de las estaquillas influyó sobre la longitud total de los brotes, de manera que cuanto mayor era el diámetro, mayor fue la longitud total de los brotes. En las estaquillas, cuyos diámetros estaban comprendidos entre 4 y 5 mm, los brotes alcanzaron más de 2 cm. Sin embargo, en la mayoría de los casos, a partir de los 7 u 8 mm alcanzaron más de 5 cm de longitud total (Figura 3.6.2).

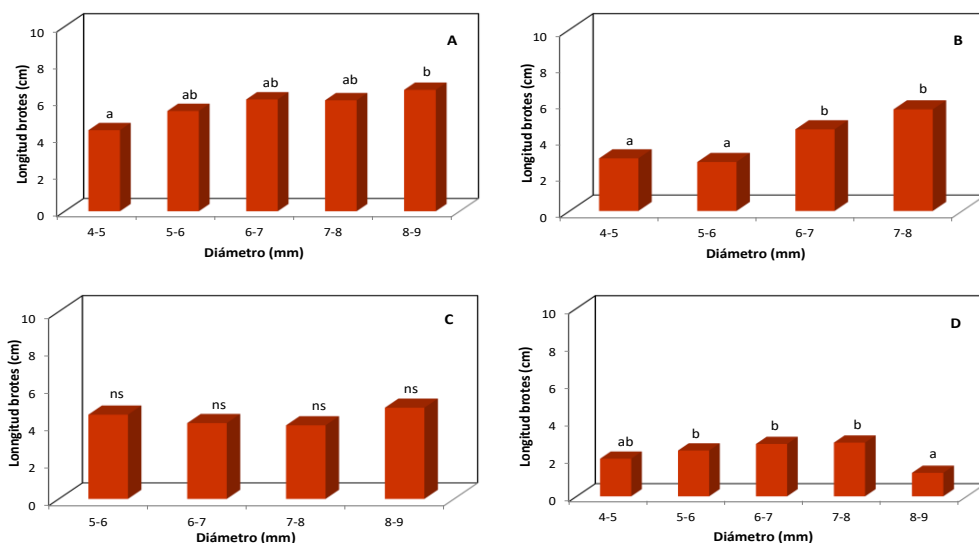


Figura 3.6.2. Longitud total (cm) de los brotes en función del diámetro (mm) de las estaquillas duras en el momento de la plantación. Medición realizada tres meses después de la fecha de plantación. (A) Material vegetal procedente de la isla de Ibiza. (B, C y D) Material vegetal procedente de Valencia. Letras diferentes en las columnas indican diferencias significativas, $P \leq 0.05$.

3.6.5. Conclusiones

- El diámetro de las estaquillas influye en el porcentaje de prendimiento de las estaquillas duras. Las estaquillas con diámetros superiores a 6 mm presentan los mejores resultados de prendimiento, sin diferencias significativas entre ellos y por debajo de 4 mm no prendieron. Las estaquillas con diámetros entre 4-6 mm dieron lugar a resultados erráticos en la mayoría de los casos.

3.7. INFLUENCIA DEL GRADO DE LIGNIFICACIÓN DE LAS ESTAQUILLAS SOBRE EL PRENDIMIENTO

3.7.1. Introducción

Las estaquillas lignificadas de alcaparra pueden recolectarse inmediatamente antes de la plantación, con las condiciones climáticas adecuadas o, con anticipación y conservarse en cámara frigorífica (a 4-5°C y humedad relativa cercana al 100 %) o bien estratificarse en un sustrato.

Los tallos con una consistencia herbácea, que se obtienen en abril-mayo en nuestras condiciones climáticas, enraízan mucho más lento que otras especies herbáceas. En este caso, la plantación ha de hacerse en invernaderos dotados de control de temperatura y humedad. Las hojas se eliminan excepto la terminal (Melgarejo, 2000).

Los trabajos científicos, hasta la fecha, sobre prendimiento de estaquillas tanto lignificadas como no lignificadas (madera suave) demuestran, por una parte, los bajos porcentajes de éxito y por otra, la gran cantidad de resultados erráticos obtenidos que exigen de estudios más exhaustivos.

3.7.2. Objetivos

Estudiar la influencia del grado de lignificación de las estaquillas sobre el prendimiento.

3.7.3. Material y métodos

Este experimento estudió el comportamiento del prendimiento de los diferentes tipos de estaquillas en función de su grado de lignificación. La lignificación de la estaquilla depende del estado en el que se encuentra la planta, es decir, de la época del año y por ello se realizaron plantaciones en tres épocas diferentes. El material vegetal que se usó para los tres ensayos fue de *C. spinosa* subsp. *rupestris*, procedente de Valencia e Ibiza.

En primer lugar, se realizó una plantación de estaquillas suaves. Esta correspondió al mes de abril, periodo en el que la planta empieza su ciclo vegetativo y la consistencia de su brotación es la denominada de madera suave.

En el diseño experimental se usaron 32 repeticiones con 7 estaquillas por repetición, la mitad de la zona basal y la otra mitad de la zona apical (Fotografía 3.7.1). Previamente a su plantación se clasificaron en función de su diámetro y su longitud, para así poder estudiar la influencia de ambos en el prendimiento.



Fotografía 3.7.1. Aspecto de la plantación de estaquillas de madera suave.

En segundo lugar, se realizaron dos plantaciones de estaquillas semiduras. La primera correspondió al mes de julio, periodo en el que la planta se encuentra en floración y su grado de lignificación es medio (Fotografía 3.7.2). La segunda se realizó en noviembre, periodo en el que la planta estaba al final de su periodo productivo.

En la plantación del mes de julio se realizaron estaquillas de la parte apical y de la parte basal de la rama. Por otro lado, en la plantación de noviembre solo se realizaron las de la parte basal de la rama. Previamente a su plantación, fueron clasificadas en función de su diámetro para poder estudiar su influencia.

Para la plantación del mes de julio, se utilizaron 32 repeticiones con 7 estaquillas por vegetación, la mitad de la zona basal y la otra mitad de la zona apical. En la plantación de noviembre se usaron 16 repeticiones con 7 estaquillas por repetición, todas ellas de la zona basal.



Fotografía 3.7.2. Aspecto de la plantación de estaquillas de madera semidura.

Finalmente, la tercera plantación fue de estaquillas duras, es decir, esquejes obtenidos de la zona basal de la planta cuando se encontraba en reposo invernal. Estas se realizaron en el mes de marzo (Fotografía 3.7.3). Para ello se realizaron tres plantaciones con un diseño experimental similar al anterior, una de material vegetal procedente de Valencia y dos de material vegetal procedente de Ibiza.



Fotografía 3.7.3. Aspecto de las estaquillas de madera dura (A). Aspecto de la plantación de madera dura (B).

Una vez realizadas las plantaciones se tomaron medidas del prendimiento de cada uno de los experimentos y se calculó el porcentaje. También se relacionó el diámetro y la longitud con el prendimiento de las estaquillas.

3.7.4. Resultados y discusión

La época de plantación de las estaquillas no fue decisiva sobre el prendimiento. Las estaquillas suaves, obtenidas de brotes tiernos en el mes de abril, presentaron valores de prendimiento superiores al 50 % (Tabla 3.7.1). Los mejores resultados de prendimiento se obtuvieron cuando las estaquillas tenían un diámetro superior a 3 mm y/o una longitud superior a 6 cm. Para las estaquillas con diámetros inferiores a 2 mm, el porcentaje de prendimiento no superó el 30 %, y para estaquillas con longitudes inferiores a 2 cm, bajó a menos del 15 % (Figura 3.7.1).

Estos resultados contrastan claramente con los obtenidos por Pilone (1990); Imbernón, 2000; Salem *et al.*, 2001; Zarza (2003), en los que la época del estaquillado de *C. spinosa* L., sí que influyó estadísticamente. Salem (2001) obtuvo porcentajes de prendimiento del 90% con estaquillados durante el mes de mayo, aunque no llegó a determinar el porcentaje de brotación.

Los resultados de prendimiento en estaquillas semiduras presentaron un comportamiento similar a las estaquillas suaves (Figura 3.7.1) y estaquillas duras (Figura 3.6.1). Las estaquillas semiduras con diámetros superiores a 6 mm alcanzaron prendimientos superiores al 80 %, y en algunos casos llegaron al 100 %. Cuando las estaquillas semiduras tenían diámetros inferiores a 5 mm los resultados de prendimiento no superaron el 40 % (Figura 3.7.2).

La época de plantación no fue decisiva para el éxito del prendimiento de estaquillas semiduras. En efecto, en nuestros experimentos, los resultados obtenidos fueron similares tanto en la plantación de julio como en la de noviembre, tardando en brotar tiempos similares y obteniendo porcentajes de prendimiento similares también. En la plantación de julio, la alcaparra estaba en plena floración y los brotes tenían una consistencia semidura, al igual que en la plantación de noviembre que estaba al final del periodo productivo (Figura 3.7.2).

Tabla 3.7.1. Influencia de la lignificación de las estaquillas sobre el prendimiento (estaquillas enraizadas y brotadas a la vez). (A y B) Material vegetal procedente de Ibiza. (C, D, E, F, G y H) Material vegetal procedente de Valencia.

Grado de lignificación	Plantación	Procedencia	Prendimiento (%)
Suave	Abril	Valencia (F)	53,0
Semidura	Julio	Valencia (G)	67,8
	Noviembre	Valencia (H)	78,3
	Marzo	Ibiza (A)	99,3
Dura	Marzo	Ibiza (B)	85,7
	Marzo	Valencia (C)	45,0
	Marzo	Valencia (D)	25,0
	Marzo	Valencia (E)	41,0

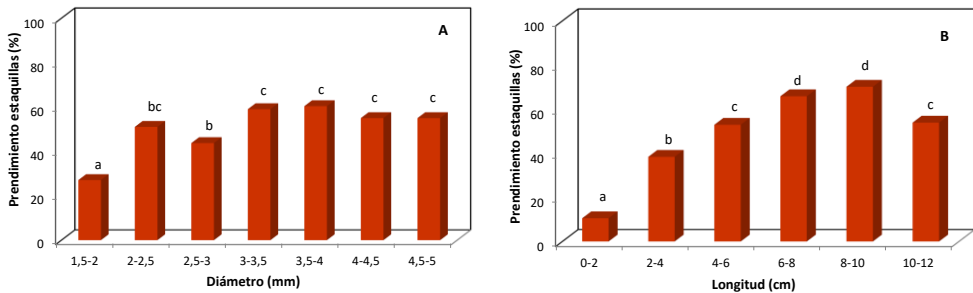


Figura 3.7.1. Prendimiento de las estaquillas suaves en función de su diámetro (A) y longitud (B). Letras diferentes en las columnas indican diferencias significativas, $P \leq 0.05$.

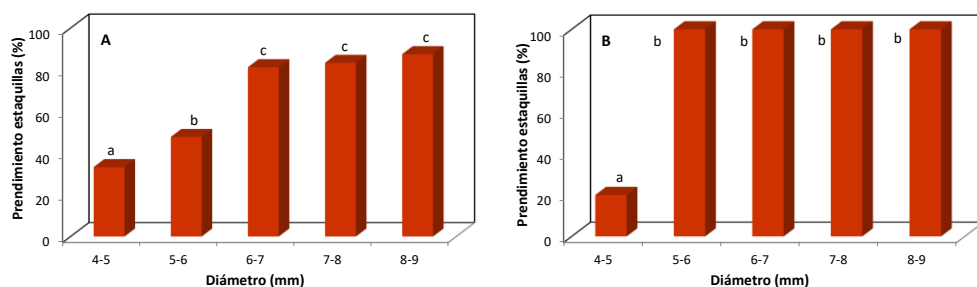


Figura 3.7.2. Prendimiento de las estaquillas basales semiduras en función de su diámetro. (A) plantación realizada en el mes de julio y (B) plantación realizada en el mes de noviembre. Letras diferentes en las columnas indican diferencias significativas, $P \leq 0.05$.

Las estaquillas apicales semiduras tuvieron un comportamiento distinto a las estaquillas suaves (Figura 3.7.1 y 3.7.3). En general, las estaquillas apicales semiduras presentaron buenos resultados de prendimiento, indistintamente del diámetro en el momento de la plantación. Para todos los diámetros estudiados, el prendimiento superó el 65 %. Los mejores resultados se alcanzaron para diámetros de 2 mm (100 %) y fueron descendiendo a medida que aumentaba el diámetro de la estaquilla.

Las estaquillas duras plantadas en el mes de marzo, momento antes de la brotación, dieron lugar a resultados dispares en cuanto a prendimiento, entre el 25 % y el 100 % (Tabla 3.7.1).

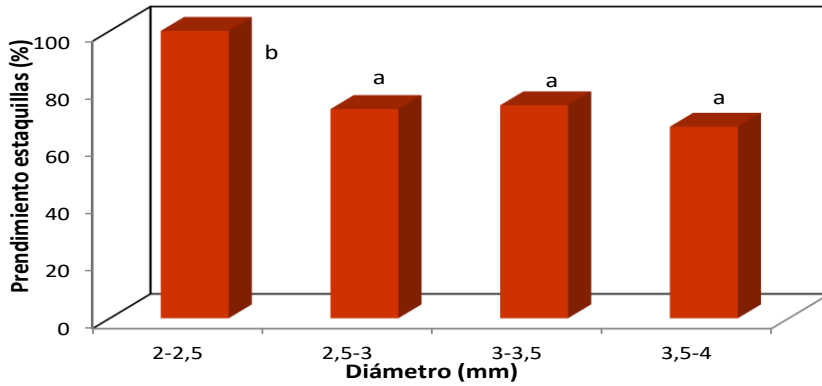


Figura 3.7.3. Prendimiento de las estaquillas apicales semiduras en función de su diámetro. Letras diferentes en las columnas indican diferencias significativas, $P \leq 0.05$.

3.7.5. Conclusiones

Las estaquillas semiduras procedentes de la zona central de la rama pueden enraizar, pero no pueden brotar cuando la única yema que poseen por nudo ya ha dado lugar a una flor o brote mixto ya que no queda ninguna yema latente.

3.8. EFECTO DE LA APLICACIÓN DE ÁCIDO INDOLBUTÍRICO (AIB) SOBRE EL ENRAIZAMIENTO Y POSTERIOR PRENDIMIENTO DE LAS ESTAQUILLAS

3.8.1. Introducción

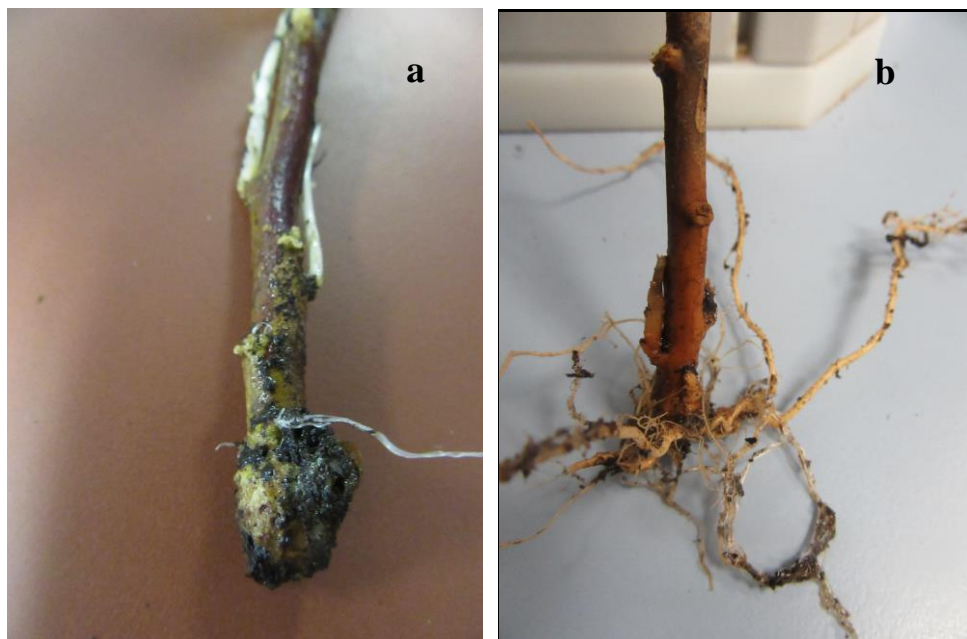
El enraizamiento es un proceso complejo consistente en varias etapas, teniendo cada una sus propios requerimientos. La realización de estudios básicos ha permitido avanzar en los conocimientos.

C. spinosa muestra una rizogénesis deficiente (Fotografía 3.8.1.) de manera natural según se constata en diversos estudios (Hamilton y Carpenter, 1975; Ramenani *et al.*, 2008).

El crecimiento y la diferenciación de las células de una planta se coordinan a través de la respuesta a los estímulos ambientales, este proceso es posible gracias a las hormonas vegetales o sustancias que se sintetizan en ciertas zonas de la planta y que, se transportan a sus lugares de acción, donde se encargan de controlar el desarrollo vegetativo. Las auxinas tienen como misión principal controlar el crecimiento de la planta, es decir, la elongación. Estas, están presentes en todas las partes de la planta, aunque son más abundantes en las partes jóvenes y en los tejidos finos ya que en dichas partes hay más presencia de los enzimas que las catalizan (Jordán y Casaretto, 2006). Entre los aspectos fisiológicos relacionados con estas hormonas, además de estimular la elongación, el crecimiento y maduración de frutos, también estimulan la formación de raíces en la propagación mediante técnicas asexuales como el estaquillado.

Las estacas de muchas especies generan espontáneamente raíces con cierta facilidad en los medios de cultivo, sin embargo, hay otras especies que tienen una mayor dificultad para enraizar. El proceso de rizogénesis se favorece por la producción de auxinas en la zona apical de las ramas y transportadas de forma basipetal. No obstante, la eliminación del ápice

reduce el nivel de auxinas endógeno en la porción basal de la estaquilla y se reduce la formación de raíces, pero la aplicación de auxinas exógenas en estos casos incrementa el número de raíces (Beyl y Trigiano, 2008).



Fotografía 3.8.1. Estaquilla de *Capparis spinosa* subsp. *rupestris* mostrando una intensidad de raíces baja (a) y alta (b).

Los preparados comerciales más importantes tienen como materia activa el ácido indol butírico (AIB), existiendo también productos comerciales a base de ácido indol acético (AIA) y ácido naftalen acético (ANA). El método de aplicación de la hormona a las estaquillas suele ser de tres formas diferentes; bien por inmersión prolongada (24 h) en una solución con la hormona, bien por inmersión rápida (5 s) en una solución concentrada de la hormona o bien tratando la base de la estaquilla con hormona en un portador inerte que mantiene la sustancia más tiempo en contacto con las estaquillas. Se cree que la auxina se libera rápidamente del talco, pero

parece que esto no ha sido demostrado (De Klerk *et al.*, 1999). La concentración óptima de la hormona que se aplica a la estaquilla varía en función de la especie vegetal. El uso de auxinas, en estos casos, favorece el crecimiento celular en las raíces adventicias de forma que se obtiene un enraizamiento mayor (Castrillón *et al.*, 2006).

La auxina penetra en las estaquillas a través de la superficie de corte, existiendo dos formas principales de actuación, la oxidación y la conjugación. El AIA y en menor medida el AIB, pueden inactivarse de manera irreversible por oxidación, mientras que el ANA no es oxidado. Parece QUE la oxidación del AIA está causada por peroxidasas no específicas relacionadas con la respuesta a la herida. En contra de lo que ocurre con la oxidación, las tres auxinas se conjugan. La conjugación es una inactivación reversible, en la que puede liberarse auxina libre a partir de las formas conjugadas. Debido a la conjugación y a la oxidación, únicamente una pequeña fracción de la auxina absorbida por el tejido ($\leq 1\%$) está en forma libre (De Klerk *et al.*, 1999).

En la formación de las raíces existen varias fases que presentan diferentes, e incluso opuestos, requerimientos hormonales. En estudios realizados en microestaquillas de manzano, De Klerk *et al.* (1999) constataron que durante las primeras 24 h las microestaquillas no eran sensibles a las auxinas, debido probablemente a que durante este periodo se produce la desdiferenciación, durante el cual las células adquieren la competencia de respuesta al estímulo rizogénico de las auxinas.

Las células a partir de las cuales se forman los primordios de raíz durante las primeras 24 h están situadas generalmente entre los haces vasculares y las acumulaciones de almidón. Después, hasta las 72 o 96 h, las células activadas son inducidas a la formación de los primordios radicales por la acción rizogénica de las auxinas; es la fase de inducción. Durante esta fase las auxinas inducen la formación de un mayor número de raíces, mientras que la 6-benziladenina (BA, citoquinina considerada antagonista de la acción de las auxinas a nivel de ADN), el ácido clorofenoxiisobutírico (antiauxina) y el ácido salicílico (monofenol que incrementa la oxidación del AIA) la inhiben. De Klerk *et al.* (1999) observaron que los granos de almidón presentes a las 24 h, se habían degradado durante las 24 h

siguientes, que las primeras divisiones celulares se produjeron a las 48 h, y que a las 96 h habían iniciales de raíz. Después de 96 h ya no se requerían auxinas, y las concentraciones de auxinas, que eran favorables para la formación de los iniciales de raíz, resultaban inhibitoras en esa fase, y la susceptibilidad a la BA había disminuido de manera importante; las iniciales de raíz se convertían en primordios radicales, con la forma típica de cúpula, y posteriormente en raíces durante la fase de diferenciación.

Las diferencias en los requerimientos de auxinas entre las tres fases de formación de raíces adventicias tienen importantes consecuencias en el enraizamiento de las estaquillas. En primer lugar, una concentración de auxina que es óptima en una fase, puede ser supra o subóptima en la siguiente. Esto parece que es lo que ocurrió en microestaquillas de manzano puestas a enraizar, de forma continuada, en un medio con diferentes auxinas (AIA, ANA, o AIB) el mejor enraizamiento se obtuvo con AIA, debido a que esta auxina es inestable y su concentración disminuyó tras 5 días de cultivo, debido sobre todo a la acción de una auxina-oxidasa. Durante los primeros días de cultivo el nivel de AIA era suficiente para inducir la formación de las raíces, pero después su concentración bajó a niveles en que su efecto inhibitor del crecimiento de raíces y brotes resultó despreciable. En cambio, el AIB y el ANA al ser más estables, su concentración se mantenía más elevada durante la fase final. De acuerdo con esta interpretación, es el AIB y no el AIA la auxina que mejor resultado proporciona, con su aplicación “a pulsos” debido a que, por su inestabilidad, la concentración de AIA disminuye rápidamente por debajo del nivel óptimo para la inducción radical. En segundo lugar, la diferencia en la susceptibilidad a las auxinas entre las fases consecutivas, podría hacer que la aplicación de auxina inmediatamente después de realizar la estaquilla fuera menos efectiva que una aplicación más tardía

3.8.2. Objetivos

Determinar los efectos del AIB sobre la rizogénesis en función del grado de lignificación de las estaquillas.

3.8.3. Material y métodos

Este experimento fue realizado, al igual que el anterior, sobre estaquillas duras, semiduras y suaves, cada una en una época. El material vegetal utilizado fue de *C. spinosa* subsps. *rupestris*, que procedía de la parcela de Valencia.

La hormona que se utilizó para estimular el crecimiento rizogénico de las estaquillas fue el AIB, al ser muy usada en estaquillas que presentan problemas de enraizamiento de muchas especies y, en particular, de *Capparis* spp.

Dentro de cada grupo de estaquillas (duras, semiduras y suaves) se clasificaron en función de su diámetro para estudiar su posible influencia cuando se aplicaban hormonas de enraizamiento.

Para estaquillas suaves (marzo) se plantaron un total de 224, la mitad de ellas sin ningún tipo de tratamiento (control) y la otra mitad con AIB. El método de aplicación del fitorregulador fue el remojo durante 20 s de los 2 - 3 cm de la parte basal de la estaquilla en una solución de AIB de 4000 mg L⁻¹ de la marca comercial Fitosanitarios INABAR S.L.

Para estaquillas semiduras solo se plantaron en el mes de julio. Se estaquillaron un total de 224 esquejes. La mitad de estos correspondieron a la parte basal, tratando con AIB a 56 estaquillas y dejando 56 más sin tratar (control). La otra mitad se correspondía a la zona apical, y del mismo modo, se trataron 56 estaquillas con AIB y se dejaron sin tratar otras 56. El método de aplicación del fitorregulador fue el mismo que para las estaquillas suaves.

Finalmente, para las estaquillas duras se realizaron dos plantaciones, ambas en el mes de marzo y con estaquillas de la zona basal. La primera de ellas fue realizada en la segunda semana del mes y se plantaron 112 estaquillas de la zona basal, 56 con AIB y 56 sin AIB. La segunda de las plantaciones se realizó la última semana del mismo mes y se estaquillaron el mismo número de esquejes que en la primera plantación tratando la mitad de

ellos con AIB y la otra mitad no. El método de aplicación fue el mismo que en los dos casos anteriores.

Una vez realizadas las plantaciones, se tomaron medidas de brotación y prendimiento durante los meses posteriores.

3.8.4. Resultados y discusión

La aplicación de AIB no mejoró los resultados de prendimiento de las estaquillas de alcaparra, indistintamente del grado de lignificación de las mismas (Tabla 3.8.1). Los resultados encontrados coinciden con los de Moreno (2000) (que estudió el efecto del AIB a 50 mg L⁻¹ en estaquillas de alcaparras, sumergiéndolas durante 12 horas antes de la plantación) y con los de Imbernón (2000), donde no hubo diferencias en el prendimiento entre las estaquillas control y las tratadas, aunque sí encontró diferencias en cuanto a su enraizamiento. Sin embargo, el efecto de la aplicación de AIB en *C. spinosa* (L.) fue diferente al encontrado por otros autores en otros cultivos. Los estudios llevados a cabo por Dhillon y Shaarma (1992) en los que se compararon varias concentraciones y tiempos de inmersión en el enraizamiento de estaquillas de granado. Sumergieron parte de las estaquillas en AIB a 50, 100 y 200 mg L⁻¹ durante 24 horas y en 500, 1000 y 2000 mg L⁻¹ durante 1 minuto encontrando que el mejor enraizamiento fue para 100 mg L⁻¹ seguido de 50 mg L⁻¹. Similares resultados encontraron Xu *et al.* (2004) en estaquillas de *Securinega suffruticosa*, tratadas con AIB con concentraciones de 50, 100 y 200 mg L⁻¹.

Tabla 3.8.1. Efecto de la utilización de AIB en el prendimiento de las estaquillas.

Grado de lignificación	Plantación	Parte de la rama	Prendimiento (%)		Significación
			Control	AIB	
Suave	Abril	Basal	46,42	51,78	n.s.
	Julio	Apical	78,57	71,42	n.s.
Semidura	Julio	Basal	71,42	64,28	n.s.
Dura	Marzo	Basal	43	47	n.s.
	Marzo	Basal	50	32	n.s.

n.s.: no significativo

El grosor de las estaquillas suaves influyó sobre el porcentaje de prendimiento. Los mejores resultados se alcanzaron con estaquillas a partir de 4 mm de diámetro. La inmersión de la parte basal de las estaquillas en una solución de AIB tuvo un efecto positivo en las estaquillas procedentes de los brotes más tiernos, cuyos diámetros eran inferiores a 2 mm. En estaquillas procedentes de los brotes más desarrollados, tuvo un efecto negativo. En efecto, las estaquillas procedentes de brotes de más de 4 mm de diámetro la aplicación de AIB tuvo un efecto negativo sobre el prendimiento de las estaquillas (Figura 3.8.1).

Las estaquillas semiduras apicales tuvieron un comportamiento distinto a las estaquillas suaves, a pesar de que su consistencia era parecida (Figuras 3.8.1 y 3.8.2). Los mejores resultados se alcanzaron para diámetros de 2,5 mm (92,3 %) y fueron descendiendo a medida que aumentaba el diámetro de la estaquilla (Figura 3.8.2).

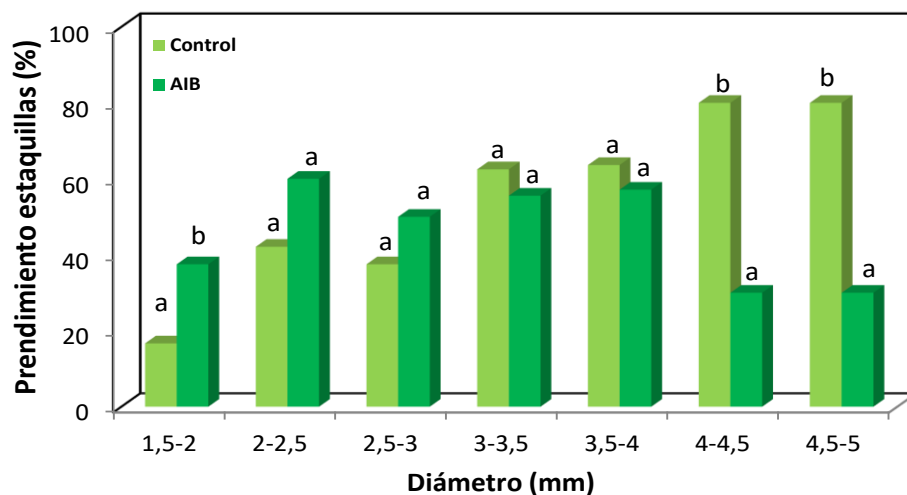


Figura 3.8.1. Efecto de la utilización de AIB en el prendimiento de las estaquillas suaves, en función de su diámetro. Letras diferentes en cada grupo de columnas indican diferencias significativas, $P \leq 0.05$.

Las estaquillas semiduras apicales tuvieron un comportamiento distinto a las estaquillas suaves, a pesar de que su consistencia era parecida (Figuras 3.8.1 y 3.8.2). Los mejores resultados se alcanzaron para diámetros de 2,5 mm (92,3 %) y fueron descendiendo a medida que aumentaba el diámetro de la estaquilla (Figura 3.8.2).

La aplicación de AIB en el momento del estaquillado tuvo un efecto positivo sobre el prendimiento cuando el diámetro de las estaquillas superó los 3 mm en el momento del tratamiento (100 %). Para estaquillas muy tiernas (2,5 mm) la aplicación de AIB tuvo un efecto negativo (53,3 %) (Figura 3.8.2).

Los mejores resultados se obtuvieron con las estaquillas de menor grosor en el control o con las de mayor grosor en el caso de la aplicación de AIB (Figura 3.8.2).

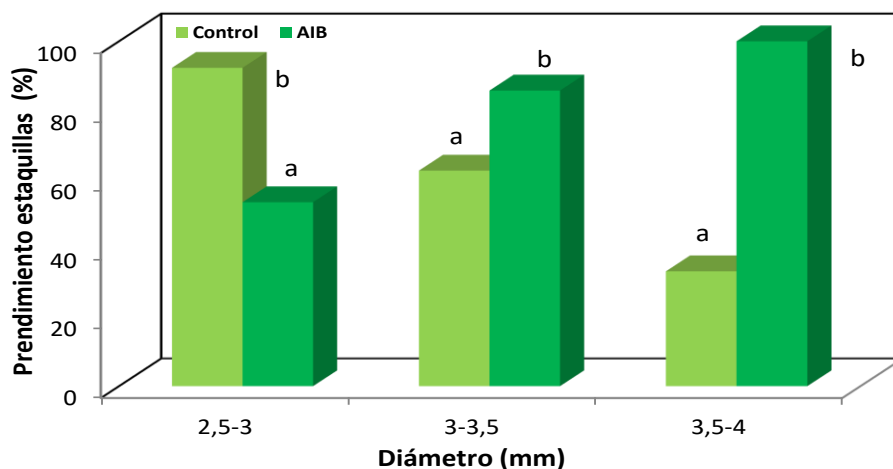


Figura 3.8.2. Efecto de la aplicación de AIB en el prendimiento de las estaquillas semiduras apicales en función de su diámetro. Letras diferentes encada grupo de columnas indican diferencias significativas, $P \leq 0.05$.

Las estaquillas semiduras basales tuvieron un comportamiento distinto a las estaquillas semiduras apicales (Figura 3.8.2 y 3.8.3). Los mejores resultados se alcanzaron para diámetros entre 6 y 7 mm (87,5 %) y para diámetros inferiores a 5 mm el porcentaje de prendimiento no llegó al 35 % (Figura 3.8.3).

La aplicación de AIB en el momento del estaquillado, en estaquillas basales semiduras, tuvo un efecto positivo sobre el prendimiento cuando el diámetro de las estaquillas superó los 7 mm en el momento del tratamiento (100 %). Para estaquillas con diámetros inferiores la aplicación de AIB no tuvo efecto o este fue negativo para estaquillas entre 4-5 mm, llegando a alcanzar valores del 0 % (Figura 3.8.3).

Las estaquillas duras basales (Figura 3.8.4) tuvieron un comportamiento similar a las estaquillas semiduras basales (Figura 11). Los mejores resultados se alcanzaron para diámetros entre 6 y 8 mm (entre 50 % y 80 %) y para diámetros inferiores a 4 mm el porcentaje de prendimiento

fue prácticamente nulo. Cuando el grosor de las estaquillas superó los 7 u 8 mm su prendimiento disminuyó (Figura 3.8.4).

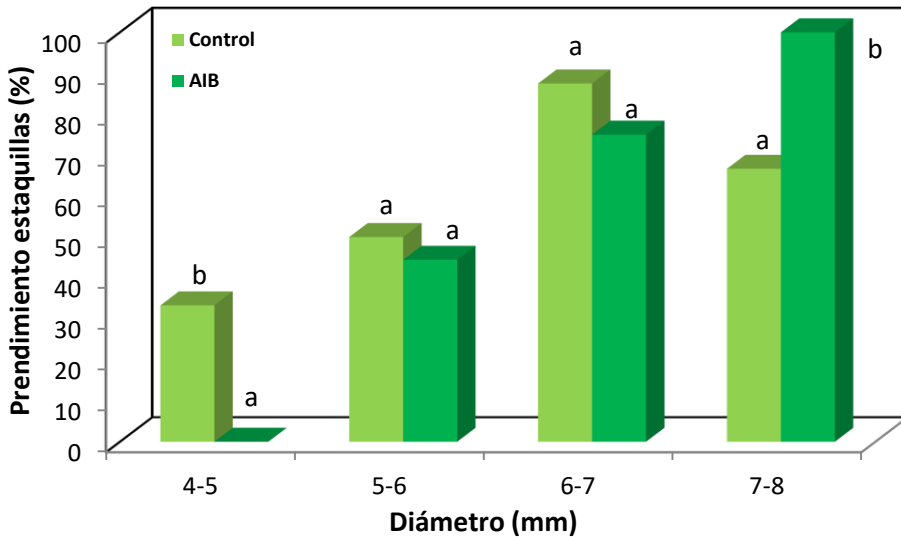


Figura 3.8.3. Efecto de la aplicación de AIB en el prendimiento de las estaquillas semiduras basales en función de su diámetro. Letras diferentes en cada grupo de columnas indican diferencias significativas, $P \leq 0.05$.

La aplicación de AIB, en el momento del estaquillado, tuvo un efecto diferente para las dos plantaciones de estaquillas duras. Tuvo un efecto negativo para la plantación realizada en la última semana del mes de marzo, ya que el grupo control obtuvo mejores resultados de prendimiento (en la mayoría de los casos). Por otro lado, en la plantación realizada el día 12 de marzo, el efecto fue el contrario, ya que en la mayoría de los casos las estaquillas tratadas con AIB presentaron mejores resultados de prendimiento (Figura 3.8.4).

La poca consistencia mostrada por los resultados según Loach (1988) pueden ser debida a que la aplicaciones pueden resultar ser

imprecisas, ya que la cantidad de hormona que pueden absorber depende de su estado, de la T^a, tiempo de aplicación, etc. Por otra parte, las auxinas aplicadas actúan conjuntamente con una cantidad indeterminada de reservas de AIA, cuyo nivel variará con el tipo de esqueje y por como se haya visto afectada la planta por las condiciones ambientales (además de las posibles interacciones de las auxinas con otras hormonas endógenas, cuya concentración también puede variar). Además, las auxinas tienen un efecto inhibitorio de las yemas laterales (Hartmann *et al.*, 2002), que puede ser diferente en función del grado de desarrollo de las mismas. En general una ratio elevada concentración de auxina/baja concentración de citoquinina favorece la formación de raíces, y una ratio baja concentración de auxina/elevada concentración de citoquinina favorece la formación de yemas adventicias (Hartmann *et al.*, 2002).

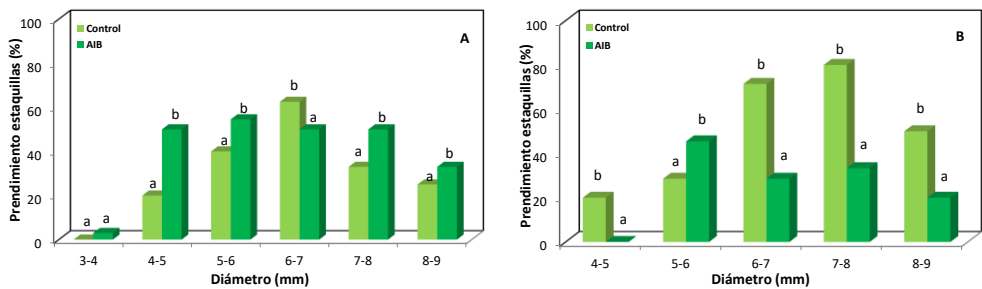


Figura 3.8.4. Efecto de la aplicación de AIB en el prendimiento de las estaquillas duras basales en función de su diámetro. (A) Fecha de plantación 12 de marzo. (B) Fecha de plantación 26 de marzo. Letras diferentes en cada grupo de columnas indican diferencias significativas, $P \leq 0.05$.

3.8.5. Conclusiones

La aplicación de Ácido indolbutírico, en general, da lugar a resultados erráticos. Sin embargo, su aplicación a estaquillas de menos de 3

mm de diámetro procedentes de brotes suaves (herbáceos) tiene un efecto positivo para su enraizamiento.

3.9. EFECTO DE LA DURACIÓN DEL TRATAMIENTO TÉRMICO A BAJAS TEMPERATURAS PREVIAS A LA PLANTACIÓN DE LAS ESTAQUILLAS DURAS

3.9.1. Introducción

La suspensión temporal del crecimiento visible sin tener en cuenta su causa, especialmente de los brotes, se conoce como latencia. Esta suspensión del crecimiento puede ser debida a condiciones externas como la temperatura desfavorable o la necesidad de agua o, causada por factores internos, incluso bajo condiciones externas favorables. No puede definirse este estado como una suspensión temporal del crecimiento, porque en el brote tiene lugar un crecimiento lento pero continuo que resulta inapreciable a simple vista como han descrito muchos investigadores.

Se ha demostrado repetidamente que muchas especies de árboles caducifolios, en nuestras condiciones climáticas, cuando se trasladan a un ambiente húmedo y tropical, se comportarán como árboles de hoja perenne. Se pueden mencionar varios fenómenos análogos que preceden a la ruptura de la latencia en árboles de hoja caduca y las que preceden a los de hoja perenne. Por ejemplo, la acumulación de almidón que precede a la brotación de los cítricos, también se asocia con el descanso en árboles de hoja caduca (Samish, 1954).

El papel que desempeña el frío en el crecimiento de los brotes no está bien definido. Algunas especies que necesitan estar expuestas a un periodo de frío en algunas zonas, cuando se cultivan en regiones tropicales, pueden crecer de forma continua con pocas o ninguna exposición a temperaturas frías como en el caso de la vid. Sin embargo, una vez la endodormancia del brote es inducida, la exposición a un periodo de frío se considera necesaria para conseguir una brotación uniforme y se ha demostrado que el número de días para que algunas especies brotaran

disminuían cuando las yemas se sometían a temperaturas inferiores a 7°C (Dokoozlian y Williams, 1995).

Los estudios, en condiciones controladas de temperatura, de Thompson *et al.* (1975) sobre necesidades de frío en manzanos cv. Jonathan de un año plantados en maceta, cuando se sometieron a un periodo de frío previo a la brotación, adelantaron la brotación, aumentaron el número de brotes y estos brotes se desarrollaron más. Los efectos de la temperatura en el rango 2-10°C, fueron mayores en el extremo inferior del rango. El enfriamiento temprano en el período de latencia fue menos efectivo que el enfriamiento posterior, más cercano a la brotación, y la interrupción del enfriamiento con periodos de alta temperatura redujo el crecimiento posterior (Thompson *et al.*, 1975).

Mahmood *et al.* (2000) estudiaron los efectos de la duración del enfriamiento a distintas temperaturas sobre la brotación y el crecimiento vegetativo en *Prunus avium* L. cv. Stella. El aumento de la exposición al frío de los cerezos causó un aumento en el número de ramas, aumentó su peso seco y adelantó la brotación. El tamaño de la flor y la longitud del pedicelo también aumentaron con el aumento de la duración del enfriamiento. Sin embargo, el crecimiento vegetativo, el tamaño de las flores y la longitud del pedúnculo tendieron a disminuir con un aumento en la temperatura posterior al enfriamiento. La producción de frutos fue mayor después de periodos de enfriamiento más largos, mientras que una mayor temperatura post-enfriamiento redujo la cantidad de cosecha.

3.9.2. Objetivos

Evaluar el efecto de los tratamientos a bajas temperaturas antes de la plantación sobre el prendimiento de las estaquillas.

3.9.3. Material y métodos

Para el estudio del efecto de la aplicación de bajas temperaturas se realizaron tres experimentos. El material vegetal utilizado se tomó de la zona basal de las ramas de *C. spinosa* subsp. *rupestris*, procedente de la parcela situada en la UPV y de los aledaños de las murallas de Ibiza. En el primer experimento, las estaquillas lignificadas, de 10 cm de longitud y entre 4 y 10 mm de diámetro, se recolectaron el 22 de febrero en parada vegetativa e inmediatamente se procedió a la plantación de los controles. El resto de estaquillas, se mantuvo en una cámara frigorífica a una temperatura de 4°C, con humedad relativa del 95% hasta el día de su plantación.

El diseño experimental fue en bloques de repetición, con 4 bloques y 7 estaquillas cada uno, para los 6 tratamientos que a continuación se detallan:

- Tratamiento 1: 0 días en frío (control).
- Tratamiento 2: 1 día en frío.
- Tratamiento 3: 2 días en frío
- Tratamiento 4: 4 días en frío.
- Tratamiento 5: 8 días en frío
- Tratamiento 6: 16 días en frío.

En total se realizó una plantación de 168 estaquillas que se mantuvo en condiciones controladas de temperatura y humedad relativa durante todo el proceso.

En el segundo experimento se usaron estaquillas procedentes de los aledaños de las murallas de Ibiza. Se establecieron dos grupos de estaquillas. Las primeras se mantuvieron en un frigorífico durante 24 h a una temperatura de 4°C. El segundo grupo de estaquillas estuvo en el mismo frigorífico durante un tiempo mayor, 48 h. Para el diseño experimental se utilizaron 4 bandejas (16 repeticiones con 7 estaquillas por repetición). En total se plantaron 112 estaquillas.

En el tercero de los experimentos se utilizaron estaquillas de la misma especie que el segundo pero procedentes de la parcela de la UPV, es decir, de Valencia. En este experimento también se establecieron dos grupos de estaquillas. El primero de ellos no fue sometido al efecto de las bajas temperaturas, es decir, se plantó el mismo día de la recolección de las estaquillas. El segundo de los grupos sí que fue sometido al efecto de la temperatura, manteniéndose (antes de plantarlo) durante 7 días en el frigorífico del laboratorio a una temperatura de 4°C.

3.9.4. Resultados y discusión

La permanencia de las estaquillas a bajas temperaturas (4°C) antes de su plantación mejoró los resultados de prendimiento (Figura 3.9.1, 3.9.2). En el primer experimento, las estaquillas que no fueron sometidas a bajas temperaturas se obtuvo un bajo prendimiento (7 %), mientras que en las sometidas a 4°C durante 16 d alcanzaron un porcentaje de prendimiento superior al 50 %. Después de mantener las estaquillas durante 1 d a 4°C se duplicó el porcentaje de prendimiento y a los 8 d, prácticamente, se había sextuplicado (Figura 3.9.1).

En el segundo experimento, cuando las estaquillas se mantuvieron durante 24 h a una temperatura de 4 °C el prendimiento fue superior al 85 % y cuando se mantuvieron durante 48 h a la misma temperatura el prendimiento mejoró hasta casi el 100 % (Figura 3.9.2 A).

Debido al éxito que se observó en el segundo experimento, se decidió realizar el tercero. En éste, la permanencia de las estaquillas a una temperatura de 4°C durante 7 d antes de su plantación hizo que se alcanzaran prendimientos cercanos al 40 %. Sin embargo, cuando las estaquillas se mantuvieron a una temperatura de 22°C durante el mismo tiempo, el porcentaje de prendimiento fue nulo (Figura 3.9.2 B).

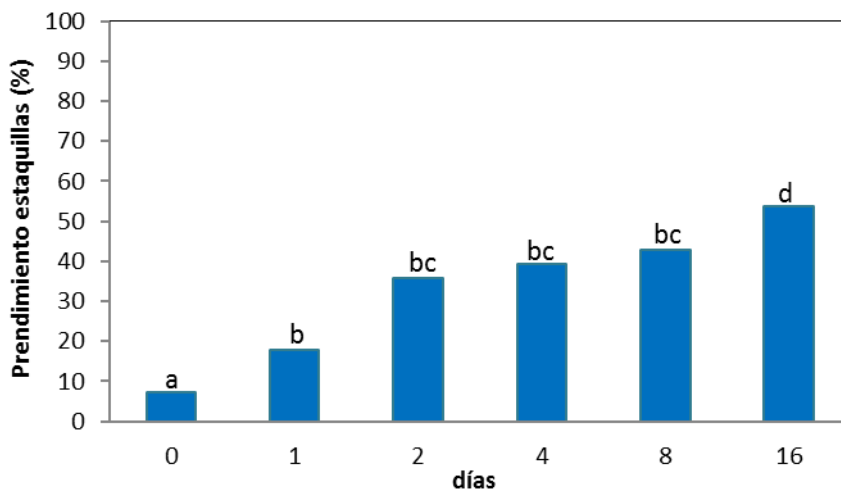


Figura 3.9.1. Prendimiento de las estaquillas en función del tiempo de permanencia a 4°C antes de su plantación. Letras diferentes en las columnas indican diferencias significativas, $P \leq 0,05$.

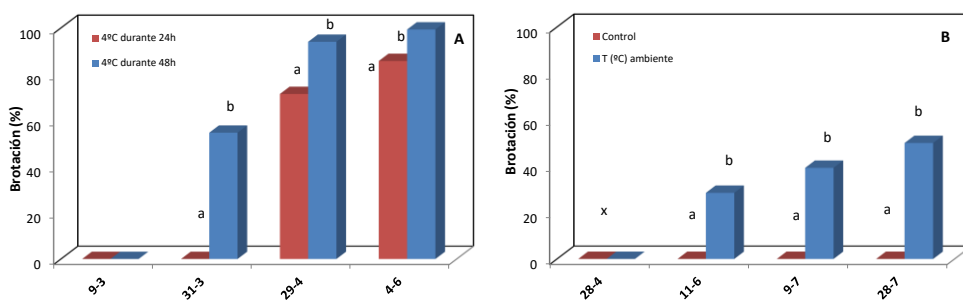


Figura 3.9.2. Evolución de la brotación en estaquillas sometidas a distintas temperaturas antes de su plantación. (A) 4°C y 22°C durante 7 d. (B) 4°C durante 24 y 48 h. Letras diferentes en las cada grupo de columnas indican diferencias significativas, $P \leq 0,05$.

La conservación durante 16 d de las estaquillas en frío mejoró los resultados en la propagación vegetativa. En un estudio paralelo, las estaquillas leñosas de alcaparra almacenadas en cámara (4°C) durante 4 meses, se conservaron en perfectas condiciones hasta el día de su plantación a finales de junio (datos no presentados). La confirmación de que esas estaquillas enraízan adecuadamente (estudio que se está realizando en la actualidad) permitiría la recolección del material vegetal una vez lignificado, en la época invernal, y plantarlo en las mejores condiciones ambientales (meses primaverales).

En el primer experimento, Las estaquillas que se mantuvieron más de una semana a 4°C brotaron en mayor medida desde el primer momento (Figura 3.9.3). En efecto, en la evaluación realizada el 7 abril, mientras que las estaquillas control habían brotado alrededor de un 7 %, en las estaquillas sometidas durante 8 y 16 d en frío habían brotado un 14,3 % y 21,5 %, respectivamente.

En el segundo experimento, las estaquillas que se mantuvieron durante más tiempo a bajas temperaturas empezaron a brotar antes. Cuando las estaquillas se mantuvieron a 4°C durante 48 h a las 3 semanas ya habían alcanzado prendimientos superiores al 50 %, mientras que las sometidas a 4°C durante 24 h no habían empezado a brotar.

En la evaluación del primer experimento realizada el 10 de mayo, mientras que un 64 % de las estaquillas sometidas a 16 d de frío habían brotado, tan sólo lo habían hecho un 11 % de los controles. Cuando las estaquillas fueron sometidas a periodos de tiempo entre 0 y 16 d, el porcentaje de brotación aumentó a medida que aumentaba el tiempo de permanencia en frío (Figura 3.9.3).

Cuando las estaquillas se sometieron el doble de tiempo a bajas temperaturas (48 h) el número de brotes por planta fue superior, alcanzándose diferencias significativas a las 6 semanas. Transcurridas 12 semanas las diferencias se redujeron debido a que se secaron algunos brotes de la zona superior de las estaquillas. Del mismo modo, la longitud total de

los brotes fue superior en las estaquillas que se sometieron más tiempo a bajas temperaturas (Figura 3.9.4).

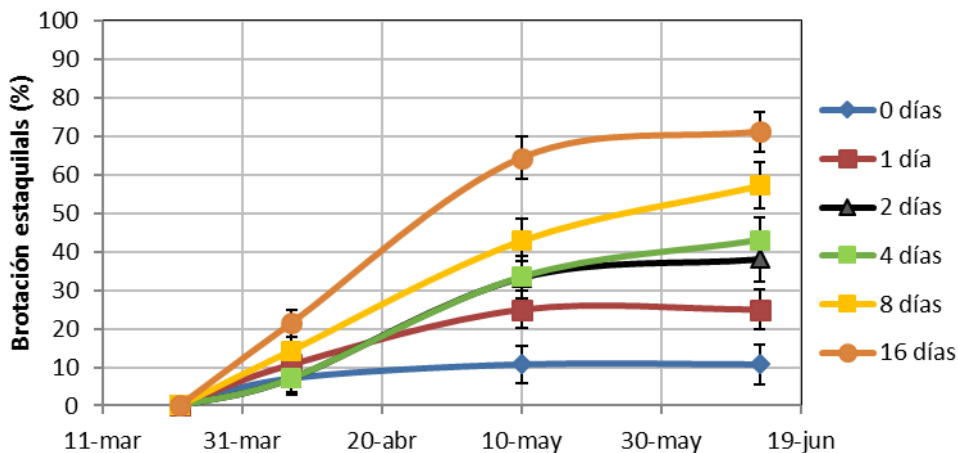


Figura 3.9.3. Evolución de la brotación de las estaquillas en función del tiempo de permanencia a 4°C antes de su plantación. Las barras de error verticales indican la desviación estándar.

El sometimiento de las estaquillas al efecto del frío durante un periodo de tiempo aumentó el número de brotes por planta (Figura 3.9.5). Por otro lado, su número aumentó a medida que la estaquilla acumuló más días de frío. En efecto, en las estaquillas que permanecieron un día en frío (Figura 3.9.5 A), en la primera de las evaluaciones, el número de brotes por estaquilla superó en un 80 % al control, mientras que las sometidas a 16 d de frío (Figura 3.9.5 B), prácticamente triplicó (270%) el resultado. Sin embargo, dos meses después estas diferencias se redujeron al 20 % en el primero de los casos y al 230 % cuanto este tiempo se prolongó a 16 d. La permanencia de las estaquillas en frío entre 1 y 16 d dio lugar a resultados intermedios a los descritos anteriormente (datos no presentados).

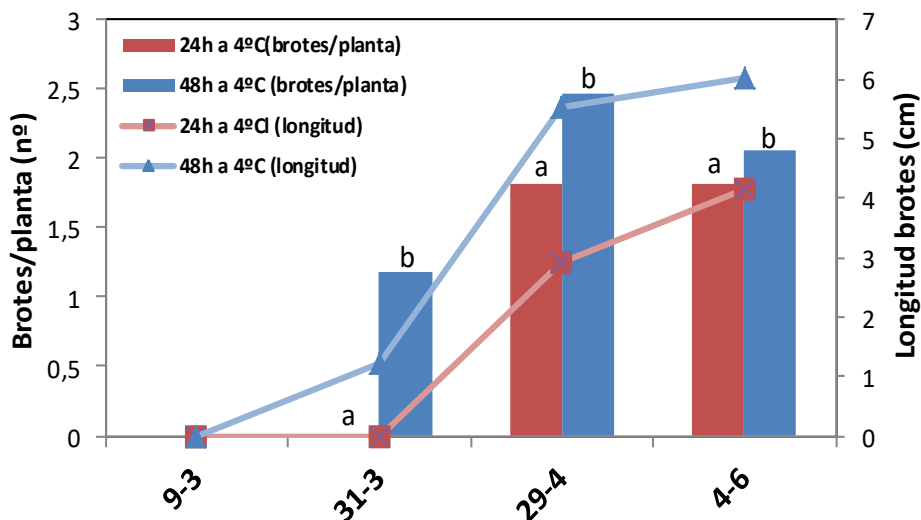


Figura 3.9.4. Evolución de la aparición de los brotes por planta y la longitud total de los brotes. Letras diferentes en cada grupo de columnas indican diferencias significativas, $P \leq 0.05$.

En cuanto a la longitud de los brotes, a pesar de que hubo una brotación vigorosa (6 y 12 cm), no se encontraron diferencias significativas entre los distintos tratamientos de frío y el control (Figura 3.9.6).

El estudio de la posición de los brotes en las estaquillas (nudos) del primer experimento permitió demostrar la causa de la reducción del número de brotes en las sucesivas evaluaciones. Las estaquillas control, una vez plantadas y antes de brotar, se empezaron a secar por su extremo superior y solamente brotó el primer nudo por encima de la superficie del sustrato y los situados por debajo de la misma, mientras que en las conservadas en frío algunas llegaron a brotar todos los nudos (Figura 3.9.7 B). Sin embargo, en algunas de las estaquillas sometidas a frío, se secó su zona apical perdiendo algunos de los brotes. El reparto de la brotación entre todos los nudos de la estaquilla fue mayor a medida que aumento el tiempo de permanencia en frío (Figura 3.9.7).

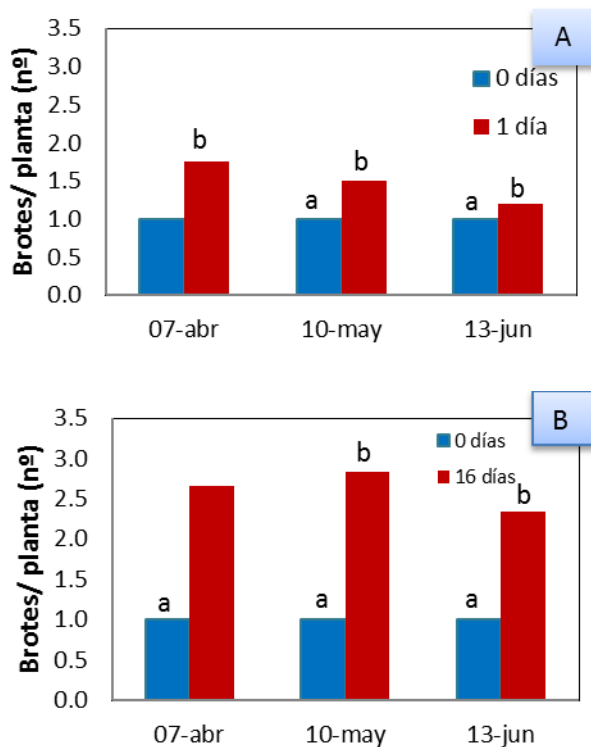


Figura 3.9.5. Evolución de la aparición de los brotes en las estaquillas en función del tiempo de permanencias a 4°C antes de su plantación [Un día (A) y 16 días (B)]. Letras diferentes en cada grupo columnas indican diferencias significativas. $P \leq 0,05$.

En el segundo experimento, las estaquillas que se mantuvieron durante menos tiempo a bajas temperaturas, brotaron en mayor proporción (24,5 % frente a 12,4 %) en el primer nudo por debajo de tierra (Figura 3.9.8). En cambio, en las estaquillas que fueron sometidas durante más tiempo a bajas temperaturas la brotación del primer nudo fue mayor (24,5 % frente a 17 %).

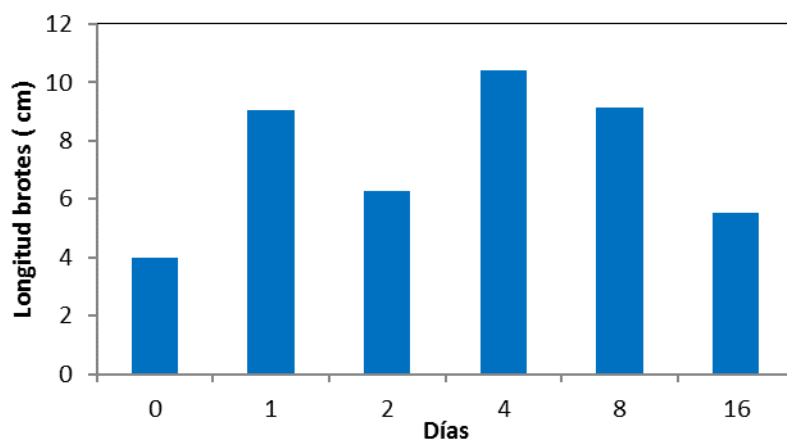


Figura 3.9.6. Longitud de los brotes en estaquillas sometidas a distintos periodos de frío 4°C antes de su plantación. No hay diferencias significativas entre los distintos tratamientos.

Los ensayos realizados por Dokoozlian y Williams (1995) con estaquillas de vid recogidas en otoño antes de que bajaran las temperaturas y sometidas a 400 h a la temperatura de 3°C, brotaron antes y de una forma más intensa que las estaquillas que no se habían sometido a bajas temperaturas. En la misma línea se encuentran los resultados de Laube *et al.* (2014) cuando sometieron estaquillas de 36 especies leñosas a bajas temperaturas en una cámara de cultivo. Estos autores concluyen que la falta de frío dio lugar a un retraso considerable en la brotación, que además provocó cambios sustanciales en el orden cronológico de la brotación de las distintas especies estudiadas. Por otra parte, Kliewer y Soleimani (1972) al introducir en cámaras de cultivo cepas de vid ‘Thompson Seedless’ y ‘Carignane’ durante 77 h a 2°C, llegaron a idénticos resultados, éstas brotaban antes y más intensamente.

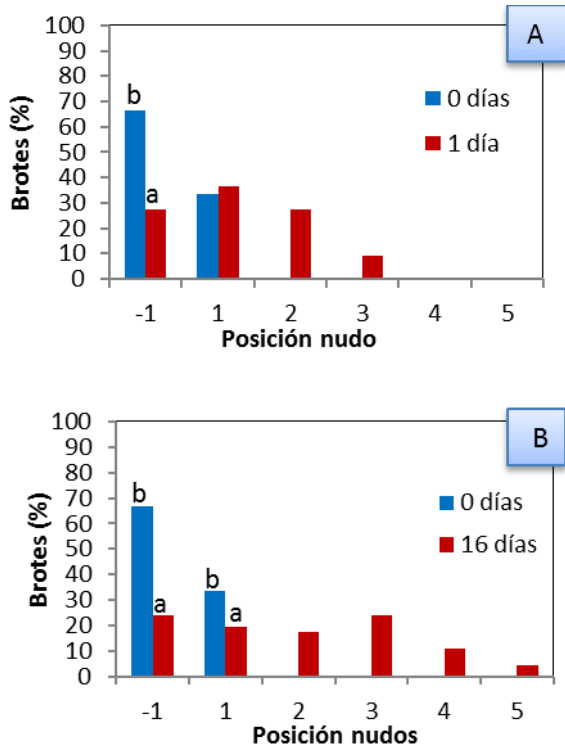


Figura 3.9.7. Posición de los brotes en la estaquilla (nudo) en función del periodo de tiempo que se han sometido a bajas temperaturas. Comparación del control con un día (A) y 16 días (B). Letras diferentes encada grupo de columnas indican diferencias significativas. $P \leq 0,05$.

Los cambios endógenos que sufren las estaquillas al ser sometidas a bajas temperaturas fueron estudiados por Hausman *et al.* (2000) en esquejes de chopo de tres meses tras ser sometidas a una temperatura de 10°C durante dos semanas. Ellos constataron que las estaquillas disminuyeron de peso, al mismo tiempo que aumentaron las cadenas de polipéptidos de alto peso molecular, contenido en sacarosa y lignina.

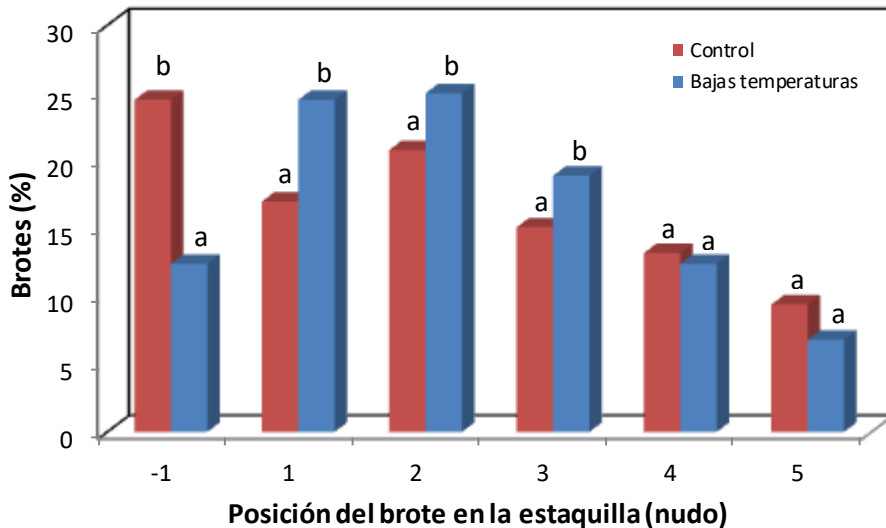


Figura 3.9.8. Porcentaje de brotes en función de su posición en la estaquilla (nudo) y el periodo de la aplicación de bajas temperaturas (4°C). Letras diferentes en cada grupo de columnas indican diferencias significativas, $P < 0.05$.

3.9.5. Conclusiones

El tratamiento de las estaquillas con bajas temperaturas antes de su plantación mejora los resultados de prendimiento, adelantando la época de brotación, así como el número de brotes por estaquilla y su longitud.

3.10. INFLUENCIA DEL SELLADO DE LOS EXTREMOS DE LAS ESTAQUILLAS PARA REDUCIR SU DESHIDRATACIÓN

3.10.1. Introducción

Las estaquillas lignificadas de alcaparra, cuando se retrasa la brotación después del estaquillado, se deshidratan la mayoría de las veces en la parte superior de las mismas y brotan, en algunos casos, las yemas que están enterradas.

En los estudios histológicos de cortes de tallo de *C. spinosa* subsp. *rupestris*, la sección de los vasos xilemáticos en relación al tamaño del tallo, es superior al de otras especies leñosas. En este sentido, las operaciones culturales que permitan reducir la deshidratación de las estaquillas podrían tener una influencia positiva sobre el prendimiento.

3.10.2. Objetivos

Analizar el efecto del sellado de las estaquillas sobre el prendimiento en base a reducir la deshidratación de sus tejidos.

3.10.3. Material y métodos

El material vegetal de *C. spinosa* subsp. *rupestris* se recolectó en la parcela de la UPV el 14 de enero, en estado de parada vegetativa, procediéndose al sellado y a la plantación.

El diseño experimental fue en bloques de repetición, con 4 bloques y 7 estaquillas por bloque, para los 3 tratamientos que a continuación se detallan:

Tratamiento 1: sin sellar (control).

Tratamiento 2: sellado del extremo superior (Figura 3.10.1 A).

Tratamiento 3: sellado de los dos extremos (Figura 3.10.1 B).

Las estaquillas lignificadas, de 10 cm de longitud y entre 4 y 10 mm de diámetro, se sellaron para reducir su deshidratación con masilla para injertos comercializada bajo el nombre de PASTOL PROFESIONAL® de COMERCIAL QUÍMICA MASSÓ, S.A. Dicha masilla está compuesta por resinas polivinílicas, aceites vegetales y sustancias cicatrizantes. La masilla se aplicó en la zona de corte y en la adyacente en una longitud aproximada de 1 cm y se dejó 2 horas al aire libre para que se solidificara antes de proceder a su plantación.

En fechas posteriores, cercanas al momento de brotación, pero en yema completamente parada (8 de marzo), se repitió el experimento con el objetivo de obtener un mejor resultado, y particularmente en las estaquillas control, para así poder corroborar en las nuevas condiciones, los resultados obtenidos con el sellado. El diseño experimental fue en este caso, similar al anterior, aunque se aumentó el número de bloques de repetición a 6 con las 7 estaquillas por bloque habituales.

En total se realizó una plantación de 84 estaquillas en enero y otra de 126 estaquillas en marzo. En ambos casos, se mantuvieron en condiciones controladas de temperatura y humedad relativa durante todo el proceso.



Fotografía 3.10.1. Estaquilla sellada en el extremo superior (a). Estaquilla sellada en los dos extremos (b).

3.10.4. Resultados y discusión

Los bajos resultados de prendimiento (3,6 %) de estaquillas tomadas de plantas en reposo invernal (14 enero) aumentaron considerablemente hasta un 80 % cuando las estaquillas fueron selladas con masilla para injertos en el extremo superior e inferior de las mismas (Figura 3.10.1 A). Sin embargo, las estaquillas selladas con dicha masilla solamente en la parte superior de las mismas, dieron lugar a peores resultados al no prender ninguna de ellas. En el segundo experimento, realizado con el objetivo de obtener un mejor resultado en las estaquillas control, y poder corroborar el

resultado obtenido en el primer momento, se obtuvieron resultados con tendencia similar. El prendimiento de las estaquillas control fue superior al 30 %, obteniéndose resultados significativamente inferiores en el caso de aplicación de masilla en el extremo superior de la estaquilla (19 %). Cuando la masilla se aplicó en los dos extremos de la estaquilla, los resultados de prendimiento duplicaron a los obtenidos en las estaquillas control (Figura 3.10.1 B). En experimentos realizados por Bhat y Chandel (1991) utilizando *Dioscorea alata* sellando los cortes de las explantos con cera de parafina para evitar la exudación encontraron un mejor resultado en su prendimiento.

El sellado del extremo basal de la estaquilla protegió la superficie de corte de la posible lixiviación de productos del metabolismo presentes en la estaquilla y de los ataques de agentes patógenos, aumentando el efecto que, de manera natural, produce la placa de suberina que se forma con la muerte de las células próximas al corte, y que protege la superficie de corte de la desecación y de los patógenos (Hartmann *et al.*, 2014). La reducción de la lixiviación ha sido confirmada con el sellado de los extremos cortados con cera de parafina en explantes de *Dioscorea alata* en cultivo *in vitro* realizados por Bhat y Chandel (1991) mejorando los resultados de prendimiento de una forma significativa.

En el primer experimento, el estudio de la evolución porcentual de la brotación acumulada se corroboró que había una gran diferencia, entre las estaquillas control (7 %) y las selladas en su parte superior (4 %), con las estaquillas selladas en ambos extremos con masilla para injertos (80 %) (Figura 3.10.2. A). Las estaquillas control y las selladas por su parte superior mostraron resultados similares, aunque apenas alcanzaron resultados del 10 %. Además, quedó patente la dificultad que tienen las estaquillas de alcaparra procedentes de plantas en estado de reposo invernal para su brotación. Prueba de ello, es que cuatro meses después de su plantación las estaquillas selladas en sus dos extremos continuaron brotando (en el cuarto mes brotaron más del 50 % de las estaquillas de las que había) (Figura 3.10.2 A).

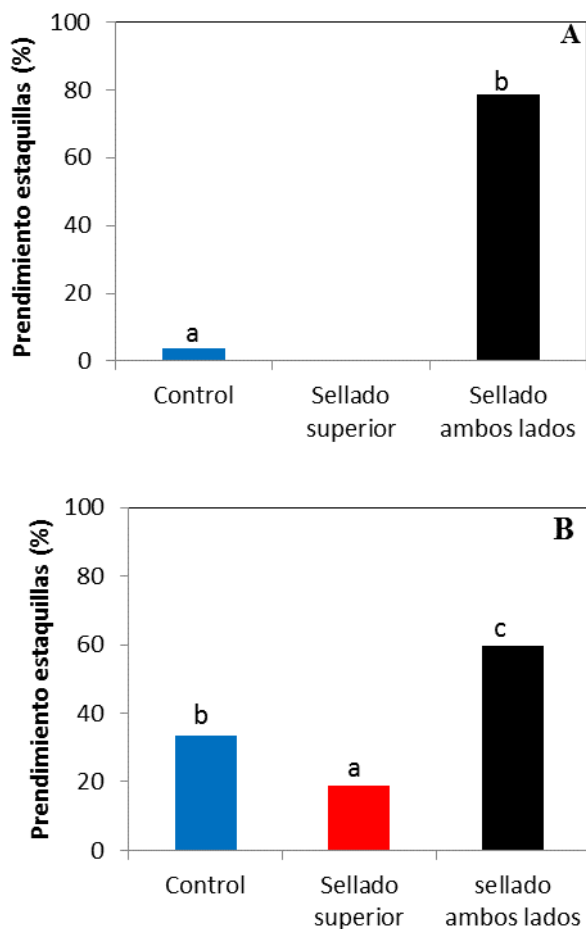


Figura 3.10.1. Prendimiento de las estaquillas en función del sellado. Estaquillado: 14 enero (A) y estaquillado 8: marzo (B). Letras diferentes en las columnas indican diferencias significativas. $P \leq 0,05$.

La recolección del material vegetal en épocas cercanas a la brotación (8 de marzo) redujo de cuatro a dos meses el tiempo para completar su brotación. La brotación de las estaquillas control y selladas en su extremo superior tuvieron un comportamiento similar, no superando en ningún caso el 33,5 % de estaquillas brotadas. Sin embargo, las estaquillas selladas en

ambos extremos, prácticamente, duplicaron este resultado (64,3%; Figura 3.10.2 B).

En el conteo final del número de brotes por estaquilla no se encontraron diferencias significativas entre los distintos tratamientos en el caso del estaquillado de marzo (Figura 3.10.3). En el estaquillado de enero, carece de importancia conocer este parámetro debido al reducido número de estaquillas prendidas en el control y en el sellado superior (Figura 3.10.2 A).

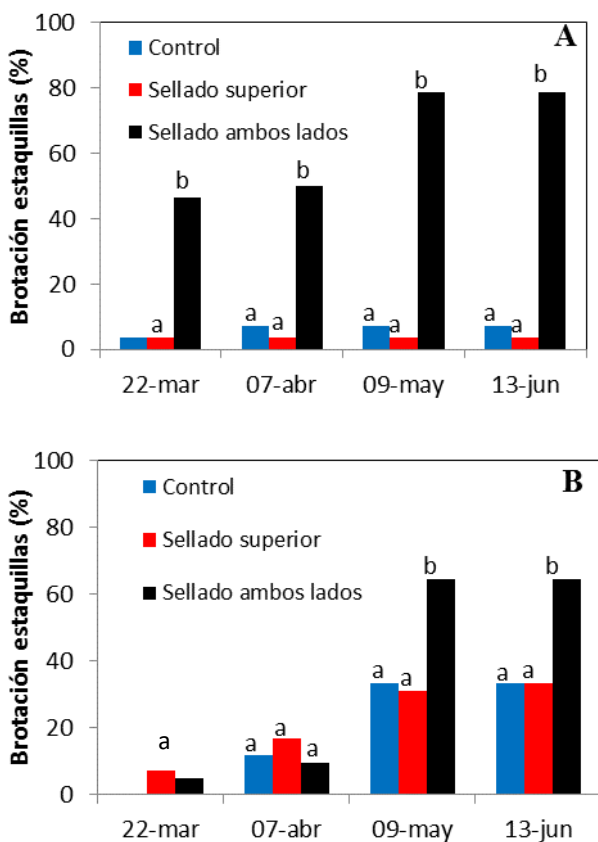


Figura 3.10.2. Evolución de la brotación en estaquillas en función del sellado. Estaquillado: 14 enero (A) y estaquillado: 8 marzo (B). Letras diferentes en las columnas indican diferencias significativas. $P \leq 0,05$.

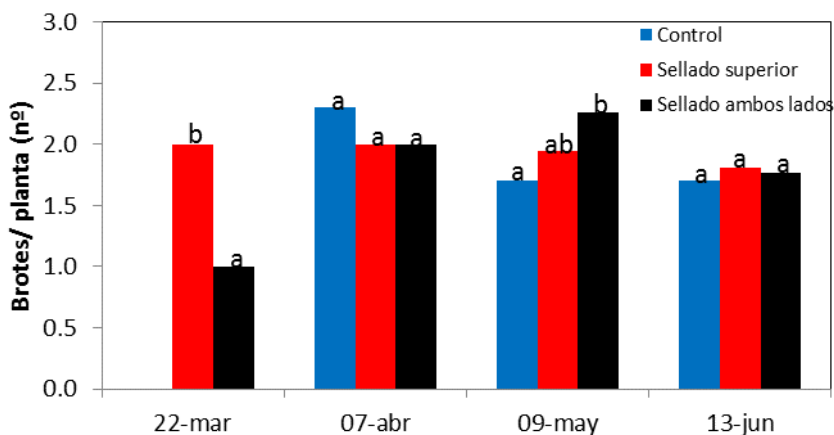


Figura 3.10.3. Evolución de la aparición y presencia de los brotes por estaquilla en función del sellado. Estaquillado: 8 de marzo. Letras diferentes en cada grupo de columnas indican diferencias significativas. $P \leq 0,05$.

La longitud (el vigor) de los brotes no se vio modificado de una forma significativa en ninguno de los tratamientos de la plantación realizada en marzo (Figura 3.10.4). Debido al escaso número de estaquillas prendidas en la plantación de enero, no se realizó el estudio del vigor de los brotes.

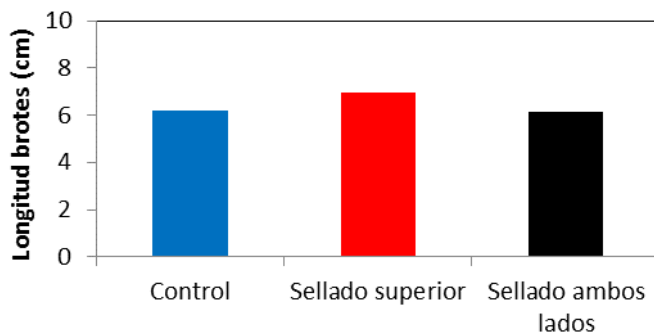


Figura 3.10.4. Longitud de los brotes de las estaquillas en función del sellado. Estaquillado: 8 de marzo. No existen diferencias significativas. $P \leq 0,05$.

En la plantación realizada en marzo la brotación estuvo repartida mayoritariamente entre los tres primeros nudos desde la superficie del sustrato, y el nudo enterrado, no presentando diferencias significativas entre los distintos tratamientos (Figura 3.10.5). No obstante, las estaquillas selladas permanecieron más tiempo sin deshidratarse permitiendo que algunas de las yemas de los nudos más apicales brotaran (nudos 4 y 5). En este sentido, Xin (2012) al sellar esquejes de *Broussonetia papyrifera* por su parte superior con cera se constató que los esquejes sobreviven durante más tiempo y su tasa de mortalidad era menor.

Debido al escaso número de estaquillas prendidas en la plantación de enero no se realizó el estudio de la posición de la brotación dentro del nudo.

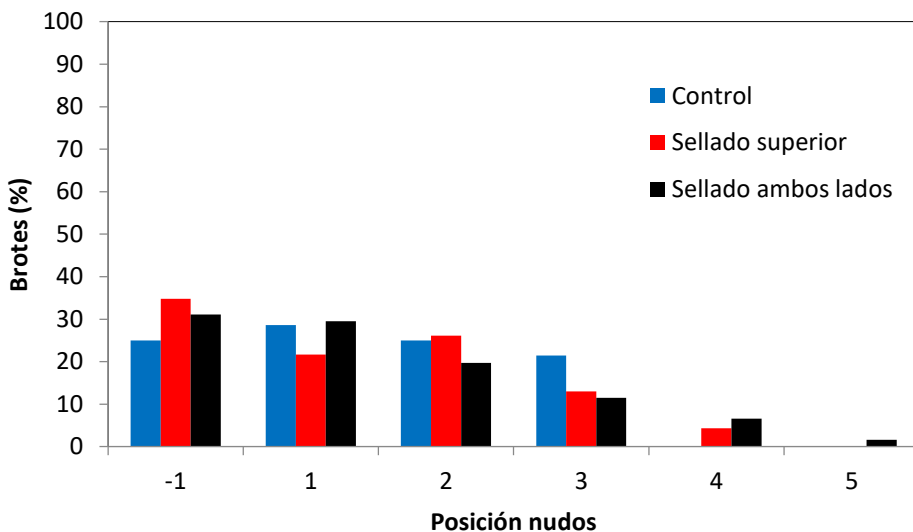


Figura 3.10.5. Posición de los brotes en la estaquilla (nudo) en función del sellado. Estaquillado: 8 de marzo. No existen diferencias significativas. $P \leq 0,05$.

3.10.5. Conclusiones

La deshidratación de la parte superior de las estaquillas provoca la brotación de las yemas más basales e incluso de las subterráneas.

El sellado de los dos extremos de las estaquillas con masilla para injertos aumenta considerablemente el porcentaje de prendimiento.

3.11. EFECTO DEL LESIONADO DE LA BASE DE LAS ESTAQUILLAS SOBRE EL PRENDIMIENTO

3.11.1. Introducción

La realización de cortes o heridas en la base de las estaquillas tiene una gran influencia en la formación de raíces al formarse callos y la aparición de raíces, preferentemente alrededor de dichas heridas (Hartmann y Kester, 1990; Sanchez y Justo, 1997).

El conocimiento de la realización de heridas para potenciar el enraizamiento probablemente es muy antiguo. Algunos investigadores interpretaron que en estos cortes se localizaba el suministro de sustancias nutritivas en forma de carbohidratos, pero más recientemente, muchos investigadores apuestan por la localización de hormonas de crecimiento en estas intervenciones físicas sobre la estaquilla. También se ha encontrado que las lesiones realizadas con un cuchillo afilado tienen menos efecto que cuando se hacen con cizallas u objetos no afilados. Esto se podría interpretar como una mejor cicatrización de la herida si unas células más han sido aplastadas. En todo caso, no parece que las heridas de los tallos tengan un efecto directo en el inicio de la rizogénesis (Larue, 1941). Los investigadores que apoyan la teoría de que la herida es, en sí misma, un iniciador de la producción de raíces, y que las hormonas de la herida son los agentes estimulantes, no lo han podido demostrar hasta la fecha.

La práctica del lesionado ha resultado útil en cierto número de especies como enebro, tuya, rododendro, arce, magnolia y acebo (Hartmann y Kester, 1991). En algunas especies, como la tuya, las lesiones se pueden producir arrancando las ramas laterales de la parte inferior de la estaca, o bien, se pueden hacer las heridas con la punta de una navaja un corte de 2.5 a 5 cm en los laterales de la parte basal de la estaca, que atraviese la corteza y llegue a la madera (Hartmann y Kester, 1990).

Para obtener el mayor beneficio, después de lesionadas las estacas se deben tratar con alguno de los compuestos que estimulan el enraizamiento, ya sea preparada en talco o solución concentrada, haciendo que el material penetre en la herida (Hartmann y Kester, 1990).

Larue (1941) encontró que en peciolos de *Coleus* y en esquejes herbáceos de algunas otras especies a las que les había practicado el lesionado, aumentaba considerablemente la formación de raíces. Del mismo modo, que los tratamientos con extractos que contienen hormonas de la herida, estimulan la formación de raíces en estaquillas leñosas. Por otro lado, tanto la realización de lesiones como los tratamientos con hormonas de enraizamiento (ácido indolbutírico) adelantan la rizogénesis. En algunas especies vegetales el efecto de la herida sobre el enraizamiento es tan importante como los tratamientos con ácido indolbutírico.

3.11.2. Objetivos

Evaluar la influencia del lesionado de la base de las estaquillas de *Capparis spinosa* L. subsp. *rupestris* para estimular su enraizamiento, y posterior prendimiento.

3.11.3. Material y métodos

El material vegetal de *C.* subsp. *rupestris* procedía de la parcela situada en la UPV. El estaquillado se realizó el 8 de marzo con estaquillas lignificadas, de 10 cm de longitud y entre 4 y 10 mm de diámetro. El diseño experimental fue en bloques de repetición, con 6 bloques y 7 estaquillas por bloque, para los 3 tratamientos que a continuación se detallan:

Tratamiento 1: Sin lesión (control).

Tratamiento 2: Cortes de 2 cm de longitud en la corteza, llegando a la madera (Figura 3.11.1 A).

Tratamiento 3: Eliminación de la corteza en una sección tipo escudete (Figura 3.11.1 B).

En total se realizó una plantación de 126 estaquillas.



Fotografía 3.11.1. Estaquillas con cortes en la corteza (a). Eliminación de sección de la corteza (b).

3.11.4. Resultados y discusión

El lesionado de la base de las estaquillas, tanto la realización de cortes en la corteza (CC) como la eliminación de una sección de la misma (EC), mejoró notablemente el prendimiento, indistintamente del tipo de lesión realizada (Figura 3.11.1). Mientras que en las estaquillas control el prendimiento apenas superó el 30 %, en las que se lesionaron superó el 60 %. El lesionado de las estaquillas consistente en la eliminación de una capa delgada de corteza de unos 2.5 cm de largo en cada lado de su base, exponiendo el cámbium pero sin cortar profundamente en la madera, ya había sido probado con estacas de magnolia y rododendro, no encontrando diferencias entre este tipo de lesionado y la realización de cortes con una navaja (Hartmann y Kester, 1990).

La herida que se produce en la estaquilla en el momento de la separación de la planta madre, en la mayoría de las especies, es necesaria para conseguir el enraizamiento. La herida produce la destrucción de compartimentos celulares (vacuolas, vesículas, peroxisomas y plastidios), lo que provoca la síntesis y/o liberación de enzimas (gluconasas, peroxidasas, fosfolipasas y lipoxigenasas) presentes en estos orgánulos celulares. Estas enzimas degradan las paredes y membranas celulares. Los productos de la degradación de estas estructuras celulares se denominan compuestos relacionados con la herida (wounding-related compounds, WRCs), y están involucrados en los procesos de defensa y por lo tanto son elicitores. Estos WRCs aplicados solos no han inducido la formación de raíces en rodajas de tallos de manzano, pero aplicados junto a concentraciones subópticas de AIB sí que han incrementado el enraizamiento. De Klerk *et al.* (1999) sugirieron que los WRCs desempeñan un papel importante en la fase de diferenciación.

Además, es conocido que la herida desencadena la síntesis de etileno, cuyo efecto en el enraizamiento se analiza posteriormente. La herida también induce estrés. Al ensayar la aplicación de compuestos relacionados con el estrés, como elicitores sistémicos (por ejemplo, el ácido salicílico),

metabolitos secundarios (como el ácido cumárico), radicales libres (el estrés oxidativo puede ser inducido por ejemplo, por paraquat), *scavengers* (reductores del estrés; vitaminas C y A, compuestos fenólicos), y brasinoesteroides (involucrados en el crecimiento y que pueden también estarlo en la respuesta al estrés). De Klerk *et al.* (1999) obtuvieron que excepto determinados compuestos fenólicos, el resto o no tuvieron efecto, o tuvieron un efecto inhibitor del enraizamiento de rodajas de tallo de manzano. Estos investigadores estudiaron el efecto de varios compuestos fenólicos, a diferentes concentraciones, en el enraizamiento de rodajas de manzano. El ácido ferúlico (AF, compuesto fenólico) incrementó el enraizamiento en presencia de AIA, pero solo muy ligeramente en presencia de ANA, lo que sugiere que el AF puede ser un inhibidor de la oxidación de auxinas (ya que el AIA puede ser oxidado, pero el ANA, no). Estos autores concluyeron que el AF y el floroglucino actúan como antioxidantes, protegiendo al AIA de la oxidación, y a los tejidos de la planta del estrés oxidativo provocado por la herida.

El efecto del etileno como estimulador del enraizamiento fue citado en 1933, por Zimmerman y colaboradores (De Klerk *et al.*, 1999; Harmann *et al.*, 2002). Posteriormente muchos investigadores han indicado el efecto positivo del etileno en el enraizamiento, y que las heridas provocadas realizadas en el estaquillado provocan la formación de etileno, que indirectamente promueve la formación de raíces adventicias (Hartmann *et al.*, 2002), aunque también ha sido citado que en ocasiones el etileno no ha tenido ningún efecto, e incluso que ha tenido un efecto inhibitor del enraizamiento (Mudge *et al.*, 1988; De Klerk *et al.*, 1999), por lo que su efecto sobre el enraizamiento no es tan predecible o consistente como el de las auxinas (Haissig y Davies, 1994). La bibliografía especializada, analizada y resumida por De Klerk *et al.*, (1999) señala una doble interacción entre auxinas y etileno. Primero, la auxina estimula la síntesis de etileno; segundo, el etileno puede aumentar la susceptibilidad de la auxina. El efecto estimulador durante la desdiferenciación ocurre únicamente a concentraciones subóptimas de las auxinas, mientras que el efecto inhibitor

durante la fase de inducción ocurre únicamente a concentraciones supraóptimas de las auxinas (De Klerk et al., 1999).

Las lesiones probablemente aumentan el número de raíces y la longitud de las mismas. En efecto, la eliminación del primer centímetro basal en estaquillas de alcornoque por Ribeiro (1993) aumentó el número de raíces y la longitud de las mismas. Resultados similares obtuvieron Iglesias *et al.* (2008) al dañar la parte basal de estaquillas de *Camelia japonica* L. consiguiendo mayores porcentajes de enraizamiento. Según Sánchez y Justo (1997) los cortes o heridas en las estaquillas tienen una gran influencia en la formación de raíces en cinco especies leñosas.

Larue (1941) afirmó que tras el anillado de tallos y/o eliminación de un anillo de corteza se favorecía el enraizamiento, lo que ya era conocido desde antiguo. En un principio se suponía que estos cortes permitían la localización del suministro de alimentos, pero después se descubrió el papel que tienen las hormonas sobre el enraizamiento. Laure (1941) propuso que las heridas en si misma son un iniciador de la producción de raíces y que las hormonas de la herida son los agentes estimulantes. Con posterioridad se descubrió que las heridas provocan síntesis de etileno, el cual favorece el enraizamiento (Westwood, 1973). Una de las evidencias encontradas fue que los tallos cortados con tijeras enraizaban mejor que cuando se cortaban con un cuchillo afilado, supuestamente por una mejor cicatrización de la herida al haber aplastado más células sin tener en cuenta el efecto (hormonal) directo de las heridas de los tallos en la iniciación de las raíces.

En la realización de heridas en la base de estaquillas suaves de albaricoquero japonés (*Prunus mume* Sieb, ET Zucc) utilizado como patrón de otros *Prunus*, no se observaron diferencias con respecto al porcentaje de enraizamiento, y longitud de las raíces (Mayer y Pereira, 2004). Sin embargo, aumentó el número de raíces y mejoró la distribución de éstas en el tejido dañado. A pesar de esto, los beneficios obtenidos no justificaron la realización del tratamiento. El lesionado no es necesario para la mayor parte de las especies y cultivares, sin embargo, como tónica general puede decirse que el lesionado es útil para el enraizamiento de una buena parte de

estaquillas de madera semidura y dura (Martínez, 2009; Maronek *et al.*, 1983).

Cuando el porcentaje de enraizamiento es muy bajo o nulo, la mayoría de los investigadores están de acuerdo en aceptar que la baja aptitud para el enraizamiento viene determinada por la ausencia de determinados factores de enraizamiento suministrados por la estaquilla, y/o la presencia de determinados inhibidores endógenos procedentes del metabolismo de la planta madre (Martínez, 2009).

Según Martínez (2009) las lesiones que se hacen en la base de la estaquilla, exponen el cambium al exterior, estimulan la división celular y la formación de primordios radicales; promueven la acumulación de azúcares y auxinas naturales en las zonas lesionadas; exponen las zonas activas a la acción y penetración de los tratamientos hormonales posteriores; facilitan la absorción de agua del esqueje; y disminuyen la resistencia física de los tejidos a la salida de las raíces que se van a formar durante el enraizamiento.

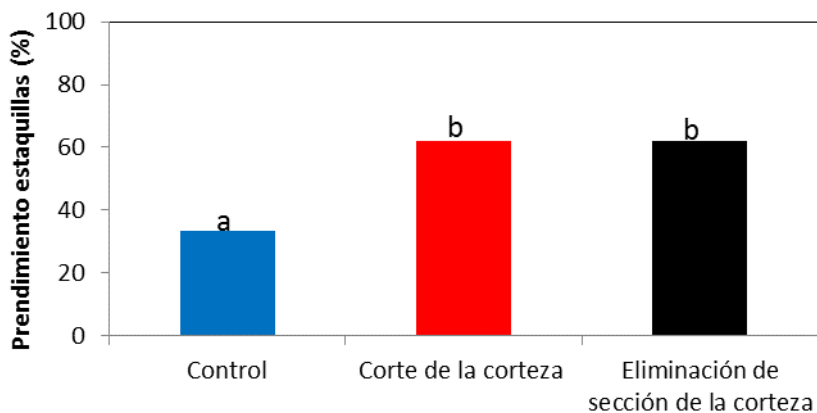


Figura 3.11.1. Prendimiento de las estaquillas en función del tipo de lesión. Estaquillado: 8 de marzo. Letras diferentes en las columnas indican diferencias significativas. $P \leq 0,05$.

Las estaquillas con eliminación de una sección de la corteza brotaron con mayor intensidad (67 %) que las estaquillas lesionadas mediante corte de la corteza (50%), y estas con mayor intensidad que las estaquillas control (33 %). Además con la eliminación de una sección de corteza, las estaquillas empezaron a brotar a los 15 d de plantación y tres meses después siguieron brotando nuevas estaquillas, mientras que las estaquillas control y en las lesionadas mediante un corte de la corteza, el máximo número de estaquillas brotadas se había completado a los dos meses, habiendo empezado a brotar las estaquillas control mas tarde (Figura 3.11.2).

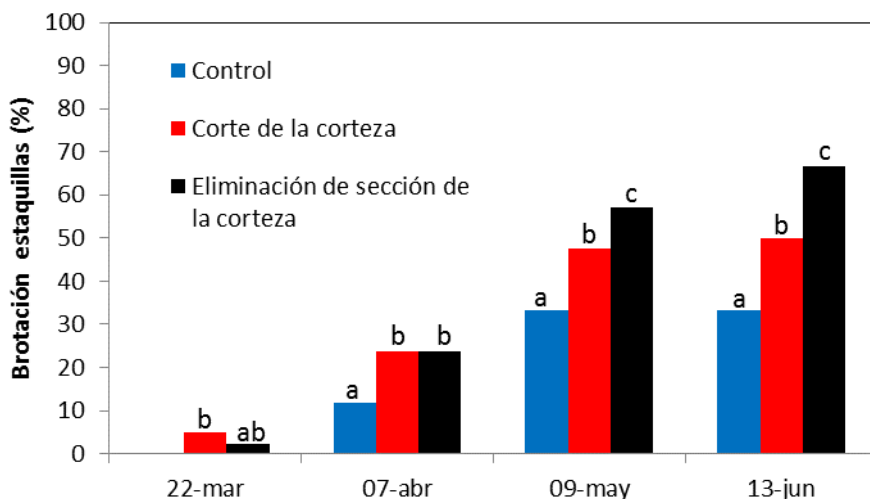


Figura 3.11.2. Evolución de la brotación en las estaquillas en función del tipo de lesión. Estaquillado: 8 de marzo. Letras diferentes en las columnas indican diferencias significativas. $P \leq 0,05$.

La longitud (vigor) de los brotes no se vio modificada de forma significativa en ninguno de los lesionados. En el conteo final del número de brotes por estaquilla no se encontraron diferencias significativas entre los distintos tratamientos (Figura 3.11.3 A). Del mismo modo, la longitud de los brotes por estaquilla tampoco presentó diferencias (Figura 3.11.3 B).

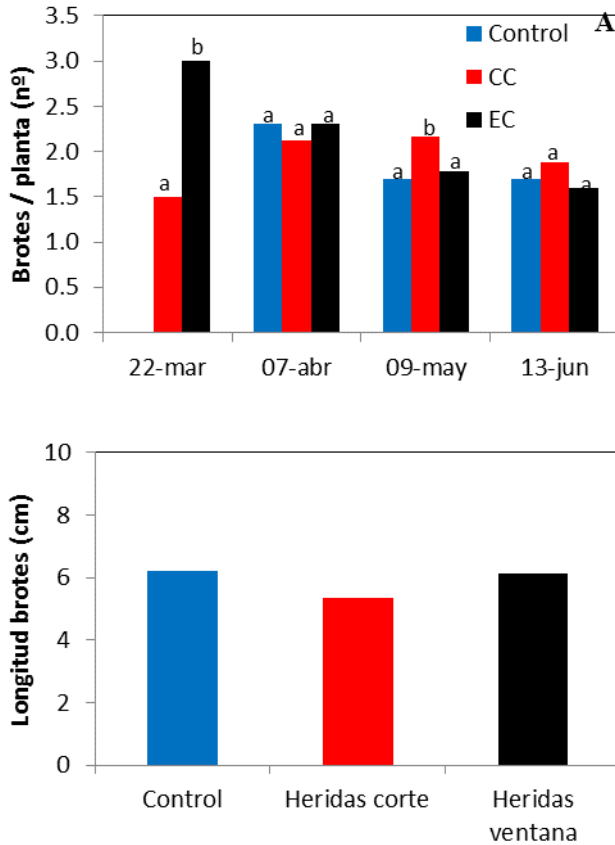
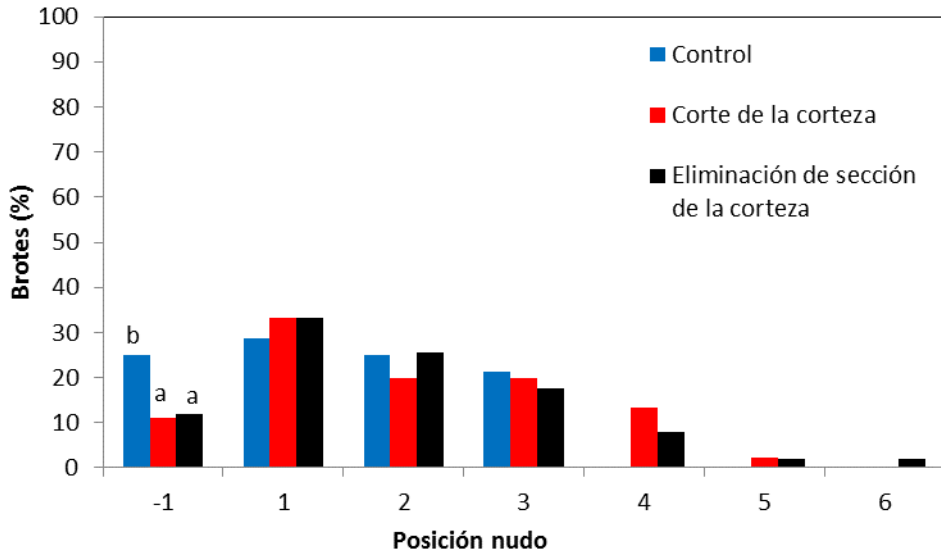


Figura 3.11.3. Evolución de la aparición de los brotes por estaquilla (A). Longitud de los brotes según el tipo de lesión (B). Estaquillado: 8 de marzo. Letras diferentes en las columnas indican diferencias significativas. En las columnas que no aparecen letras, no existen diferencias significativas. $P \leq 0,05$.

En los tres primeros nudos sobre la superficie del sustrato, se encontró el mayor número de yemas brotadas sin presentar diferencias significativas entre los distintos tratamientos. Sin embargo, en las estaquillas control al secarse antes por la parte apical, el nudo subterráneo brotó con mayor intensidad y en las estaquillas lesionadas presentaron algunos brotes

en los nudos 4, 5 y 6. En las estaquillas control no se observaron yemas brotadas por encima del tercer nudo (Figura 3.11.4).



F
Figura 3.11.4. Posición de los brotes en la estaquilla (nudo) en función del tipo de la lesión. Estaquillado: 8 de marzo. Letras diferentes en cada grupo de columnas indican diferencias significativas. En los grupos de columnas que no aparecen letras, no existen diferencias significativas. $P \leq 0,05$.

3.11.5. Conclusiones

El lesionado de la base de las estaquillas, tanto cortes a la corteza, como eliminación de parte de la misma, mejoró el prendimiento, indistintamente de la lesión realizada.

4. CONCLUSIONES GENERALES

Las conclusiones generales de esta tesis doctoral, presentadas por apartados son:

PROPAGACIÓN SEXUAL

Histología

- Se ha realizado la descripción histológica del ovario, fruto y semilla, comprobándose que la cubierta es bitégmica, formada por testa y tegmen.
- El exotegmen presenta una discontinuidad en la zona del hilo.

Ecotipos

- No existen diferencias en la viabilidad de las semillas de los lotes de las subespecies *rupestris* y *spinosa*.
- Las semillas de la subespecie *rupestris* germinan antes y en mayor proporción que las de la subespecie *spinosa*.
- Se ha comprobado que la viabilidad, y consecuentemente la germinación, de algunos lotes de semillas, incluido un lote de semillas comercial, es nula.

Absorción de agua por parte de las semillas

- Las semillas de alcaparra no necesitan ser troceadas antes del secado en la determinación de su humedad.
- En el remojo y en el ensayo de germinación de las semillas, la absorción inicial del agua por parte de las mismas, previa a la emergencia de la radícula, presenta las dos primeras fases del

modelo típico trifásico de absorción de agua en la germinación de las semillas. La estabilización de la imbibición depende de las características de las semillas, y en los lotes ensayados es variable, por lo que se aconseja prolongar el ensayo de imbibición de las semillas hasta los 8 días.

- Las cubiertas de las semillas, consideradas en sentido amplio, incluyendo el hilo, no son impermeables al agua, permitiendo la absorción de la misma, al ser puestas a remojo, por tanto, estas semillas no presentan latencia física. La discontinuidad que presenta el exotegmen junto al hilo, constituye la puerta de entrada de agua cuando las semillas se encuentran a remojo o en un sustrato húmedo.
- El incremento de humedad obtenido a partir del tercer día de remojo en las semillas escarificadas, coincide con la tercera fase del modelo trifásico de absorción de agua en la germinación de las semillas, concurrente con la emergencia de la radícula, al romperse la cubierta de la semilla.

Escarificación

- La radiación láser He-Ne, con las densidades y periodos de exposición ensayados, no mejora la germinación de estas semillas. La duración del tratamiento de irradiación láser no ha afectado al tamaño de las plántulas.
- Las plántulas procedentes de las semillas irradiadas y germinadas en sustrato humedecido con AG₃, presentan un menor tamaño que las semillas germinadas en sustrato humedecido con agua.
- La incubación de las semillas con el complejo *Trichoderma reesei* provoca una disminución del contenido en celulosa, hemicelulosa y lignina de las semillas, y la consiguiente presencia de sólidos solubles en la solución del complejo enzimático, es decir que consigue la escarificación de las semillas.

- La escarificación enzimática es un método adecuado para mejorar la germinación de estas semillas. Con las concentraciones más elevadas del complejo *Trichoderma reesei*, se obtienen porcentajes de germinación muy elevados, y con la adición posterior de AG₃ al sustrato, se consigue la germinación de todas las semillas viables.
- Con la incubación con el complejo Driselasa se consigue una mejora en la germinación, sin llegar a alcanzar los niveles obtenidos con *Trichoderma reesei*.

Germinación

- La función logística resulta adecuada para analizar la germinación de todos los lotes de semillas utilizados, incluidos los de la subespecie *spinosa*.
- La adición de AG₃ al sustrato adelanta y aumenta la germinación de las semillas, consiguiendo que germinen todas las semillas viables.

Edad de las semillas

- La longevidad de la semilla o periodo de viabilidad media está comprendida entre 4 y 4.5 años.
- Iniciando la realización del ensayo de germinación inmediatamente después de la recolección, y con la adición de AG₃ al sustrato se alcanzan porcentajes de germinación muy próximos al 100%.
- En la misma campaña en la que se ha producido la semilla, la germinación disminuye de forma importante con el secado de la semilla, lo que se intensifica con la dilación del inicio del ensayo, por lo que no es aconsejable retrasar más de 30 días el inicio del ensayo de germinación, para obtener, de esta manera, porcentajes de germinación superiores al 90%.

Estratificación

- La estratificación refrigerada de las semillas de adelanta y aumenta el porcentaje de germinación. La prolongación de la estratificación permite acortar el ensayo de germinación. El remojo de 48 horas previo a la estratificación refrigerada, mejora su efecto.
- La evolución del contenido hormonal durante la estratificación refrigerada de las semillas coincide totalmente con el modelo trifásico, típico de las semillas que presentan latencia embrional: disminución del contenido en ABA en la primera fase; incremento del contenido en giberelinas y citoquininas en la segunda fase; disminución del contenido en giberelinas y citoquininas en la tercera fase.
- A partir del momento en que se registra el mayor valor de la concentración de giberelinas, coincidente con el mayor valor de la relación giberelinas/ABA, se obtiene el mayor porcentaje de germinación, dependiendo la duración óptima de la estratificación de la adición, o no, de AG₃ al sustrato.
- La estratificación cálida de las semillas mejora y adelanta la germinación de las semillas, en mayor medida que la estratificación refrigerada.
- Con la estratificación cálida durante un periodo de 15 días y la adición de AG₃ al sustrato se han obtenido porcentajes de germinación que superan el 90% de las semillas viables.

PROPAGACIÓN VEGETATIVA

- Se ha realizado la descripción histológica de la raíz, tallo y hoja de *Capparis spinosa* subsp. *rupestris*, comprobándose la existencia de una sola yema por nudo, descartándose la presencia de yemas latentes que pudieran dar lugar a nuevos brotes y, la presencia de unas características anatómicas que favorecen una alta conductividad hidráulica, compatibles con una estrategia adaptativa.
- La propagación vegetativa de *Capparis spinosa* L. con estaquillas de madera dura o semidura presenta un comportamiento similar, y solo es viable de manera genérica con estaquillas tomadas de la posición basal de la rama; en las tomadas de la parte central de la rama únicamente es posible si existe una yema.
- Con la utilización de estaquillas de madera dura en estado de yema hinchada (marzo en las condiciones climáticas de Valencia), pueden alcanzarse prendimientos prácticamente del 100 %.
- Los nudos de las ramas solamente poseen una única yema y ésta puede dar lugar a una única flor o a un brote mixto (hojas y flores) por nudo.
- Al comienzo de la brotación, las yemas de los primeros nudos de las ramas permanecen latentes. A partir de un número determinado de nudos contados a partir de la base de las ramas, la totalidad de sus yemas dan lugar a una flor o a un brote mixto y, solamente en contadas excepciones se quedan latentes.
- Las estaquillas tomadas a partir de un determinado número de nudos contados a partir de la base, como han consumido la única yema existente, no pueden brotar y hacen inviable su propagación vegetativa por estaquilla. Únicamente las yemas de las estaquillas, que de forma excepcional no han brotado en el momento del estaquillado hacen posible el prendimiento de las estaquillas.

- En las estaquillas semiduras procedentes de la zona central de la rama pueden enraizar, pero no pueden brotar si sus yemas ya han dado lugar a flores o brotes y no queda ninguna yema.
- El diámetro de las estaquillas influye en el porcentaje de prendimiento, tanto en las estaquillas de madera dura como en las estaquillas semiduras. Los resultados mejoran al aumentar el diámetro de las estaquillas de madera dura.
- La aplicación de ácido indolbutírico a estaquillas de menos de 3 mm de diámetro procedentes de brotes suaves tiene un efecto positivo para su enraizamiento, pero su efecto no es evidente en otros tipos de estaquillas.
- Las estaquillas leñosas en estado fenológico de yema hinchada de *la* subsp. *rupestris* tuvieron un mayor prendimiento que las de *la* subsp. *spinosa*, por lo que, desde el punto de vista de la propagación, no hay ningún inconveniente para utilizar la subsp. *rupestris*.
- El tratamiento de las estaquillas con bajas temperaturas antes de su plantación, mejora el prendimiento, adelantando la época de brotación, así como el número y la longitud de los brotes por estaquilla. Con este tratamiento se reduce la deshidratación de la parte superior de las estaquillas, favoreciendo la brotación de las yemas más apicales.
- La deshidratación de la parte superior de las estaquillas provoca la brotación de las yemas más basales, incluso de las subterráneas.
- El sellado de los dos extremos de las estaquillas con masilla para injertos aumenta considerablemente el porcentaje de prendimiento.
- El lesionado de la base de las estaquillas, mejora el prendimiento, indistintamente de la lesión realizada.

5. BIBLIOGRAFIA

ABBAS, J. A.; EL-OGHAH, A. A.; MAHASNEH, A. M. 1992. Herbal plants in the traditional medicine of Baharain. *Economic Botany*, 46: 158-163.

AGENCIA EFE. 2011. El alto coste laboral acaba con el cultivo de alcaparras que liberaba España, consultado 05/05/2016. <http://agencias.abc.es/agencias/noticia.asp?noticia=914545>.

AHMED, O. M. M.; ADAM, S. E. I. 1980. The toxicity of *Capparis tomentosa* in sheep and calves. *Veterinary and human toxicology*, 23: 403-409.

AHMED, O. M. M.; ADAM, S. E. I.; EDDS, G. T. 1981. The toxicity of *Capparis tomentosa* in goats. *Journal of Comparative Pathology*, 90: 187-195.

AHMED, O. M. M.; AMIN, A. E.; ADAM, S. E. I.; HAPKE, H. J.. 1993. By toxic effects of the dried leaves and stem of *Capparis tomentosa* on Nubian goats. *Deutsche Tierärztliche Wochenschrift*, 100: 192-4.

ALKIRE, B. 1998. Capers. Purdue New "Crop FactSheet. Center for New Crops and Plant Products. Purdue University. <http://www.hort.purdue.edu/newcrop/cropfactsheets/caper.html>.

AL-SAFADI, B.; ELIAS, R. 2011. Improvement of caper (*Capparis spinosa* L.) propagation using *in vitro* culture and gamma irradiation. *Scientia Horticulturae*, 127: 290-297.

AL-SAID, M. S. 1983. Tradicional medicinal plants of Saudi Arabia. *The American Journal of Chinese Medicine*, 21: 291-298.

AL-SAID, M. S.; ABDELSATTAR, E. A.; KHALIFA, S.I; EL-FERALY, F. S. 1988. Isolation and identification of an anti-inflammatory principle from *Capparis spinosa*. *Pharmaie*, 43: 640-641.

AL-SAQRI, F.; ALDERSON P. G. 1996. Effects of AIB, cuttings tipe and rooting media on rooting of *Rosa centifolia*. *Journal Horticulturae Science*, 71 (5): 729-737.

ÁLVAREZ, A., RAMÍREZ, R., CHÁVEZ, L., CAMEJO, Y., LICEA, L., PORRAS, E., GARCÍA, B. (2011). Efecto del tratamiento de semillas con láser de baja potencia, sobre el crecimiento y rendimiento en plantas de tomate (*Solanum lycopersicum L.*). *ITEA* 107:290-299.

ALVARRUIZ, A.; RODRIGO, M.; MIQUEL, J.; GINER, V. FERIA, A; VILA, R. 1990. Influence of bringing and packing conditions on product quality of capers. *Journal of Food Science*, 55: 196-198.

AMEER, A. 2014. Assessment of the antioxidant properties of the caper fruit (*Capparis spinosa L.*) from Bahrain. *Journal of de Association of Arab Universities for basic and Applied Science*, 19: 1-7.

ANDRADE, G.; ESTEBAN, E.; VELASCO, I.; LORITE, M. J.; BEDMAR, E. J. 1997. Isolation and identification of N₂-fixing microorganisms from the rhizosphere of *Capparis spinosa (L.)*. *Plant Soil*, 197: 19-23.

ANDREU, V.; RUBIO, J. L.; CERNI, R. 1994. Use of a shrub (*Medicago arborea*) for control water erosion on steep slopes. *Soil Use Management*, 10: 95-99.

APICIO, M. G. *Arte coquinaria*. Ed. 1709. Amstelodami (Ámsterdam).

BAGYANARAYANA, G.; BRAUN, U.; SUTTON, C. 1994. *Neoramularia caparidis* spec. Nov. *Micotaxon*, 51: 35-36.

BALAGUERA-LÓPEZ, H. E.; DEQUIZ, Y. A.; ÁLVAREZ-HERRERA, J. G. 2009. Plántulas de tomate (*Solanum lycopersicum L.*) provenientes de semillas embebidas en diferentes soluciones de giberelinas (GA₃). *Agronomía Colombiana*, 27:57-64.

BARBERA, G.; BUTERA, F. M. 1992. Diffusion of innovative agricultural production systems for sustainable development of smail islands: a

methodological approach based on the science of complexity. *Environmental Managements*, 16: 667-679.

BARBERA, G.; DI LORENZO, R. 1982. La coltura specializzata del capero nell'isola di Pantelleria. *L'informatore Agrario*, 32: 22112-217.

BARBERA, G.; DI LORENZO, R. 1984. The caper cultura in Italy. *Acta Horticulturae*, 144: 167-171.

BARBERA, G.; DI LORENZO, R.; BARONE, E. 1991. Observations on *Capparis* populations cultivated in Sicily and on their vegetative and productive behaviour. *Agricoltura Mediterranea*, 121: 32-39.

BASKIN, C. C.; BASKIN, J. M. 1998. *Seeds: ecology, biogeography, and evolution of dormancy and germination*. Academic Press, New York.

BASKIN, C. C.; BASKIN, J. M.; 2014 Second edition. *Seeds: ecology, biogeography, and evolution of dormancy and germination*. Academic Press, New York.

BASKIN, J. M.; BASKIN, C.C. 2004. A classification system for seed dormancy. *Seed Science Research*, 14, 1-16.

BEN SALEM, A.; ZEMNI, H.; GHORBEL, A. 2001. Propagation of caper (*Capparis spinosa* L.) by herbaceous cuttings and *in vitro* culture. *Agricoltura Mediterranea*, 131: 42-48.

BESNIER, F. 1989. *Semillas. Biología y tecnología*. Mundi-Prensa, Madrid.

BEWLEY, J. D.; BLACK, M. 1994. *Seeds. Physiology of development and germination*. Plenum Press, New York.

BEWLEY, J. D.; BRADFORD, K. J. 2006. Imbibition. p. 346. In: BLACK, M.; BEWLEY J.D.; HALMER P. (eds.). *The encyclopedia of seeds, science, technology and uses*. CABI, Trowbridge, U.K.

BEYL, C. A.; TRIGIANO, R. N. 2008. *Plant propagation. Concepts and laboratory exercises*. CRC Pres, pp: 144.

- BHAT, S. R.; CHANDEL, K. P. S. 1991. A novel technique to overcome browning in tissue culture. *Plant Cell Reports*, 10: 358-361.
- BLACK, M.; HILHORST, H. W. 2006. Dormancy – acquisition. p. 181-182. In: Black, M.; Bewlwy, J. D.; Halmer, P. (eds.). *The encyclopedia of sedes, science, technology and uses*. CABI, Trowbridge, U.K.
- BODDUPALLI, S.; MEIN, J. R.; LAKKANNA, S.; JAMES, D.R. 2012. Induction of phase 2 antioxidant enzymes by broccoli sulforaphane: perspectives in maintaining the antioxidant activity of vitamins A, C, and E. *Frontiers in Genetics*, 3: 1-15.
- BOE. 100. Orden de 12 de abril de 1984, publicada el 26 de abril de 1984. Normas de calidad para el comercio exterior de alcaparras y alcaparrones.
- BOE. 304. Real Decreto 679/2016 de 16 de diciembre. Norma de calidad de las aceitunas de mesa.
- BOKHARI, M. H.; HEDGE, I. C. 1975. Anatomical characters in *Capparis spinosa* and its allies. *Notes Royal Botanic Garden Edinburgh*, 34: 231-240.
- BOND, R. E. 1990. The caper bush. *The Herbarist*, 56: 77-85.
- BRADBEER, J. W. 1994. *Seed dormancy and germination*. Blackie Academic & Professional, London, UK.
- BREVARD, H.; BRAMBILLA, M.; CHAINTREAU, A.; MARION, J. P.; DISERENS, H. 1992. Occurrence of elemental Sulphur in capers (*Capparis spinosa* L.) and first investigation of the flavors profile. *Flavour and Fragrance Journal*, 7: 313-321.
- BUITINK, J.; CLAESSENS, M. M. A. E.; HEMMINGA, M. A.; HOEKSTRA, F. A. 1998. Influence of water content and temperature on molecular mobility and intracellular glasses in seeds and pollen. *Plant Physiology*, 118: 531-534.

- CAGLAR, C.; CAGLAR, S.; ERGIN, O.; YARIM, M. 2005. The influence of growth regulators on shoot proliferation and rooting of *in vitro* propagated caper. *Journal Environmental Biology*, 26: 479-485.
- CAMACHO, M. Z. 2012. Caracterización estructural de metabolitos secundarios de *Capparis ovaliolia*. Pontificia Universidad Católica del Perú.
- CAPPELLETTI, C. 1946. Sulla germinazione dei semi di *Capparis spinosa* L. *Nuovo Giornale Botanico Italiano*, 53: 368-371.
- CARRA, C.; SAJEUA, M.; ABBATE, L. 2012. *In vitro* Plant regeneration of Caper (*Capparis spinosa* L.) from floral explants and genetic stability of regenerants. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 109: 373-381.
- CARRA, A.; SIGNORE, M. B.; SOTTILE, F.; RICCI, A.; CARIMI, F. 2012 b. Potential use of new diphenylurea derivatives in micropropagation of *Capparis spinosa* L. *Plant Growth Regulation*, 66: 229-237.
- CEPERO, L., MESA, A. R., GARCÍA, M., SUÁREZ, J. 2002. Efecto de la radiación laser en semillas de *Albizia Lebbeck*. I. Fase de vivero. *Pastos y Forrajes*, 25(3):181-187.
- CHALAK, L.; ELBITAR, A. 2006. Micropropagation of *Capparis spinosa* L. subsp. *Rupestris* Sibth. & Sm. By nodal cuttings. *Indian Journal Biotechnology*, 5: 555-558.
- CHALAK, L.; ELBITAR, A.; CORDAHI, N.; HAGE, C.; CHEHADE, A. 2003. *In vitro* propagation of *Capparis spinosa* L. *Acta Horticulturae*, 616: 335-338.
- COHN, M. 2006. Dormancy. p. 177-180. In: BLACK, M.; BEWLEY J.D.; HALMER P. (eds.). *The encyclopedia of seeds, science, technology and uses*. CABI, Trowbridge, U.K.
- COLUMELA, L. J. M. 42. *Los doce libros de agricultura*. Traducción de J. M. Álvarez de Sotomayor. Tomo II, Edición de 1979. Sociedad NESTLE. A.E.P.A., Santander.

CONEV, R.; SANDHU, P. 2015. Effect of achene coat scarification, Maceration and stratification on seed germination in cold hardy garden roses. *Acta Horticulturae*, 1064: 247-251.

CONTRERAS-CORNEJO, H. A.; MACÍAS-RODRÍGUEZ, L.; DEL-VAL, E.; LARSEN, J. 2016. Ecological functions of *Trichoderma* spp. and their secondary metabolites in the rizhosphere: interactions with plants. *FEMS Microbiology Ecology*, 92: (17 pp).

COPELAND, L. O.; McDONALD, M.B. 1995. *Seed science and technology*. Chapman Hall, New York, USA.

CORNEJO, X.; ILTIS, H. 2012. *Capparaceae. Flora de Jalisco y áreas colindantes*. Fascículo 25. Editado por Universidad de Guadalajara. México. 71 pp.

CORNER, E. J. H. 1976. *The seeds of dicotyledons*. Volume 1 y 2, Cambridge: Cambridge University Press.

COSTA, M. R. G. F.; CARNEIRO, M. S. de S.; PEREIRA, E. S.; MAGALHÃES, J. A.; COSTA, N. de L.; MORAIS NETO, L. B.; MOCHEL FILHO, J. E.; BEZERRA, A. P. A. 2011. Utilização do feno de forrageiras lenhosas nativas do Nordeste brasileiro na alimentação de ovinos e caprinos. *Pubvet*, 5: 17 páginas no numeradas.

COSTA, R.; ROSSI, M. 2005. *Alcaparras*. Universidad del CEMA. Argentina.

COSTILLA-HERMOSILLO, M. G., ORTIZ-MORALES, M. LOZA-CORNEJO, S. 2010. Influencia de irradiación laser He-Ne sobre la germinación de semillas y crecimiento de plántulas de *Stenocactus multicosatus* (Cactaceae). VII Simposio Internacional sobre la Flora Silvestre en Zonas Áridas. *Ecología, Manejo y Conservación*: 454-466

CUNNINGHAM, E.; JANSON, C. 2007. Integration information about location and value of resources by White-faced saki monkeys (*Pithecia pithecia*). *Animal Cognition*, 10 : 293-304.

CHAPIN, F. S. 1980. The mineral nutrition of wild plants. *Annu. Rev. Ecol. Syst.*, 11: 233-260.

CHÁVEZ-SIFONTES, M.; DOMINE, M.E. 2013. Lignina, estructura y aplicaciones: métodos de despolimerización para la obtención de derivados aromáticos de interés industrial. *Avances en Ciencias e Ingeniería*, 4: 15-46.

CHEN Y. P., LIU Y. J., WANG X. L., REN Z. Y. ; YUE, M. 2005. Effect of microwave and He-Ne laser on enzyme activity and biophoton emission of *Isatis indigotica* Fort. *Journal of Integrative Plant Biology*, 47:849-855.

DAFNI, A.; SHMIDA, A. 1996. The posible ecológical iimplications of the invasión of *Bombus terrestres* (L.) (Apidae) at Mt Carmel. In: MATHESON, A.; BUCHMANN, S. L.; O'TOOLE, C.; WESTRICH, P.; WILLIAMS, I. H. (eds.). *The conservation of bees*. Academic Press, London.

DAHAL, P.; NEVINS, D. J.; BRADFORD, K. J. 1997. Relationship of endo- β -D-mannanase activity and cell wall hydrolysis in tomato endosperm to germination rates. *Plant Physiology*, 113:1243-1252.

DARBY, W. J.; GHALIOUNGUI, P. GRIVETTI, L. 1977. *Food: the gift of Osiris*. Academic Press, London.

DELGADO-SÁNCHEZ, P.; ORTEGA-AMARO, M. A.; JIMÉNEZ-BREMONT, J. F.; FLORES, J. 2011. Are fungi important for breaking seed dormancy in desertspecies? Experimental evidence in *Opuntia streptacantha* (Cactaceae). *Plant Biology*, 13: 154-159.

DELGADO-SÁNCHEZ, P.; ORTEGA-AMARO, M.A.; RODRÍGUEZ-HERNÁNDEZ, A. A.; JIMÉNEZ-BREMONT, J. F.; FLORES, J. 2010. Further evidence from the effect of fungi on breaking *Opuntia* seed dormancy. *Plant Signaling & Behavior*, 5: 1229-1230.

DELIBALTOVA, V., IVANOVA, R. 2006. Impact of the pre sowing irradiation of seeds by He-Ne laser on the dynamics of development of cotton varieties. *Journal of Environmental Protection and Ecology*, 7: 909-917.

- DESAI, B. B. 2004. *Seeds handbook*. Marcel Dekker, Inc. New York, USA.
- DHILLON, W. y SHAARMA, K. K. 1992. Effect of indolebutyric acid (AIB) on rooting of cutting in pomegranate. *Journal Research*, 29: 350-354.
- DIARIO OFICIAL DE LA UNIÓN EUROPEA. 2014. Reglamento (UE) N°752/2014 de la Comisión de 24 de junio de 2014 por el que se sustituye el anexo I del Reglamento (CE) n° 396/2005 del Parlamento Europeo y del Consejo. 15.07.2014.
- DINKOVA-KOSTOVA, A. T.; KOSTOV, R. V. 2012. Glucosinolates and isothiocyanates in health and disease. *Trends in Molecular Medicine*, 18: 337-347.
- DIOSCÓRIDES, P. (Dioscórides Anazarbeo, Pedacio) *Materia medica* (Acerca de la materia medicinal, y de los venenos mortíferos. Edición de 1555, Juan Latio, Anvers.
- DOKOOZLIAN, N. K.; WILLIAMS, L. E. 1995. Chilling exposure and hydrogen cyanamide interact in breaking dormancy of grape buds. *HortScience*, 30: 1224-1247.
- EISIKOWITCH, D.; IVRI, Y.; DAFNI, A. 1986. Reward partitioning in *Capparis* spp. along ecological gradient. *Oecologia*, 71: 47-50.
- EL TALMUD. *Tratado de Berajot* (2). Edición de 2004. EDAF, Madrid.
- ELLIS, R.H.; HONG, T. D.; ROBERTS, E. H. 1990. Moisture content and the longevity of seeds of *Phaseolus vulgaris*. *Annals of Botany*, 66: 341-348.
- ELLIS, R. H.; ROBERTS, E. H. 1981. An investigation into the possible effects of ripeness and repeated threshing on barley seed longevity under six different storage environments. *Annals of Botany*, 48: 93-96.
- ERESII, T. (TEOFRASTO) *Libri de historia et de causis plantarum*. Edición de 1821, Lipsiae.

ESCUELA MEDICA SALERNITANA. *Regimen Sanitatis Salernitanum*. Edición de 1480, cum expositione magistri Arnaldi de Villanova. Bernardinum Venetum de Vitalibus, Venice.

FAIRUSHINA, S. A. 1974. Capparis spinosa L, a destroyer of architectural monuments in Uzbekistan (in Russian). *Uzbekskii Biollogicheskii Zhurnal*, 18: 39-42.

FERNÁNDEZ, A., 2015. Estudio para la mejora de la germinación de las semillas de *Capparis spinosa* L. Trabajo Final Grado. Universitat Politècnica de València.

FERNÁNDEZ, J.; JORDANO, D. 1986. Distribución y biología de *Colitis evagore* (Klug, 1928) en el valle del Guadalquivir. *Boletín de la Estación Central de Ecología*, año 15, 29. Instituto Nacional de la Conservación de la Naturaleza, Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación, Madrid.

FICI, S.; GIANGUZZI, L. 1997. Diversity and conservation in wild and cultivated Capparis in Sicily. *Bocconea*, 7: 437-443.

FICI, S.; THULIN, M.; KERS, L. E. 1993. Capparaceae. In: *Flora of Somalia*. Tulin, M. (ed.). Vol. 1. *Pteridophyta; Gymnospermae; Angiospermae (Annonaceae-Fabaceae)*. Royal Botanic Garden, Kew, U.K.

FINCH-SAVAGE, W.E.; LEUBNER-METZGER, G., 2006. Seed dormancy and the control of germination. *New Phytologist*, 171: 501–523

FINNEY, D. J. 1962. *Probit analysis*. Cambridge at the University Press, Cambridge, U.K.

FIORINI, L.; GUGLIELMINETTI, L.; MARIOTTI, L.; CURADI, M.; PICCIARELLI, P.; SCARTAZZA, A.; SARROCCO, S.; VANNACCI, G. 2016. *Trichoderma harzianum* T6776 modulates a complex metabolic network to stimulate tomato cv. Micro-Tom growth. *Plant Soil*, 400: 351-366.

FOOTITT, S.; HOLDSWORTH, M. H. 2006. Dormancy breaking. p. 203-204. In: BLACH, M.; BEWLEY, J.D.; HALMER, P. (eds.). *The*

encyclopedia of seeds, science, technology and uses. CABI, Trowbridge, U.K.

GADGOLI, C.; MISHRA, S. H. 1999. Antihepatotoxic activity for p-methoxy benzoic acid from *Capparis spinosa*. *Journal of Ethnopharmacology*, 66: 187-192.

GADGOLI, C.; MISHRA, S. H.; 1995. Preliminary screening of *Achillea millefolium*, *Cichorium intybus* and *Capparis spinosa* for antihepatotoxic activity. *Fitoterapia*, 66: 319-323.

GALLATELLI, D.; DI FRANCO, A. 1987. Characterization of caper latent virus. *Journal of Phytopathology*, 119: 97-105.

GARCÍA, D. E.; MEDINA, L. J.; COVA, J.; HUMBRÍA, J.; TORRES, A.; MORATINOS, P. 2008. Preferencia caprina por especies forrajeras con amplia distribución en el estado de Trujillo, Venezuela. *Archivos de Zootecnia*, 57: 403-13.

García, E. 1988. Spring and summer hosts for *Pieris rapae* in sothern Spain with special attention to *Capparis spinosa*. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 48: 173-178.

GENDUSO, P. 1990. La situazione fitosanitaria delle principali colture dell'isola di Pantelleria. *Agricoltura*, 38: 102-104.

GERMENÀ, M. A.; CHIANCONE, B. 2009. *In vitro* germination and seedling development of caper (*Capparis spinosa* L.) mature seeds. *Acta Horticulturae*, 839: 181-186.

GHAZANFAR, S. A. 1994. *Handbook of Arabian medicinal plants*. CRC Press, Boca Raton, FL.

GHAZANFAR, S. A.; AL-SABAHI, A. M. A. 1993. Medicianl plants of Northern and Central Oman (Arabia). *Economic Botany*, 47: 89-98.

GHORBEL, A.; SALEM, A.; KHOULDI, S.; SKOURI, H. ; CHIBANI, F. 2001. Le câprier caractèrisation et multiplication. *Laboratoire d'Adaptation*

et d'amélioration des plantes. En: *Des modèles biologiques à l'amélioration des plantes*. Laboratoire d'Adaptation et d'amélioration des plantes, 158-172.

GOPUMADHAVEN, S. ; JAGADEESH, S. ; CHAUHAN, B. L.; KULKARNI, R. D. 1993. Protective effect of Liv.52 on alcohol-induced fetotoxicity. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research*, 17 : 1089-1092.

GOSLING, P. 2006. Stratification. p. 681. In: BLACK, M.; BEWLEY J.D.; HALMER P. (eds.). *The encyclopedia of seeds, science, technology and uses*. CABI, Trowridge, U.K.

GROOT, S. P. C., KARSSSEN, C.M. 1987. Gibberellins regulate seed germination in tomato by endosperm weakening: a study with gibberellin-deficient mutants. *Planta* 171: 523-531.

GROOT, S. P. C., KIELISZEWSKA-ROKICKA, B., VERMEER, E., KARSSSEN, C. M. 1988. Gibberellin-induced hydrolysis of endosperm cell walls in gibberellin-deficient tomato seeds prior to radicle protrusion. *Planta* 174: 500-504.

GÜLERYÜZ, M.; ÖZKAN, G.; ERCIÇLI, S. 2009. Caper (*Capparis* spp.) growing techniques and economical importance. 1st International Symposium on Sustainable Development, June 2009, Sarajevo: 94-97.

GULL, T.; ANWAR, F.; SULTANA, B.; CERVANTES, M.; NOUMAN, W. 2015. *Capparis* species: A potential source of bioactives and high-value components: A review. *Industrial Crops and Products*, 67: 81-96.

GUNN, D. 1918. The Bagrada bug (*Bagrada hilaris*). Union of South Africa. Department of Agriculture. Pretoria Bulletin, 9: 1-19.

HARTMANN, H. D.; KESTER, D. E. 1990. Propagación de plantas. CECSA, Mexico.

HARTMANN, H. D.; KESTER, D. E.; DAVIES, F. T. 2002. *Plant Propagation. Principles and practices*. 7th ed. Prentice-Hall, New Jersey.

HARTMANN, H. D.; KESTER, D. E.; DAVIES, F.T. 2014. *Plant Propagation. Principles and practices*. 8th ed. Pearson Education Limited, Edimburgh Gate, Harlow.

HAUSMAN, J. F.; EVERSS, D.; THIELLEMENT, H.; JOUVE, L. 2000. Compared responses of poplar cuttings and *In vitro* raised shoots to short-term chilling treatments. *Plant Cell Reports*, 19: 954-960.

HERNANDEZ, A. C., DOMINGUEZ, P.A., CRUZ, O.A., IVANOV, R., CARBALLO, C. A., ZEPEDA, B. R. 2010. Laser in agriculture. *Institute of Agrophysics*, 24: 407-422.

HEYDECKER, W.; URPHANOS, P. I. 1968. The effect of excess moisture on the germination of *Spinacia oleracea* L. *Planta*, 83: 237-247.

HEYWOOD, V. H. 1985. *Caprales*. In: *Las plantas con flores*. Ed. Reverté, Barcelona.

HEYWOOD, V. H. 1964. *Capparis*. In: *Flora Europaea*. Vol. 1. Eds. Tutin, T.G.; Heywood, V. H.; Burges, N. A.; Valencitne, D. H.; Walters, S. M.; Webb, D. A. Cambridge University Press, Cambridge.

HIGTON, R. N.; AKEROYD, J.R. 1991. Variation in *Capparis spinosa* L. in Europe. *Botanical Journal of the Linnean Society*, 106 : 104-112.

HILLMAN, G. C. 1989. Late Palaeolithic plant foods from Wadi Kubbaniya in Upper Egypt: dietary, diversity, infant weaning, and seasonality in a riverine environment. p. 207-230. In: HARRIS, D.R. ; HILLMAN, G.C. (eds.). *Foraging and farming: the evolution of plant exploitation*. Unwin Hyman, London.

HORSHATI, E.; JÁMBOR-BENCZÚR, E. 2006. *In vitro* propagation of *Capparis spinosa*. *Acta Horticulturae*, 725: 151-154.

HUENCA, L. 2010. *Métodos de reproducción asexual en plantas y su aplicación*. Escuela Profesional de Ingeniería Agronómica, Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad Nacional del Altiplano Puno-Perú, 33 pp.

HunterLab. 2012. Measuring color using L.a.b. versus CIE 1976 L*a*b*. En www.hunterlab.com Consultado 10 abril 2017.

HUSAIN, A., VIRMANI, O. P.; POPLI, S. P.; MISRA, L. N.; GUPTA, M. M.; SRIVASTAVA, G. N.; ABRAHAM, Z.; SINGH, A. K. 1992. *Dictionary of Indian medicinal plants*. Central Institute of Medicinal and Aromatic Plants, Lucknow, India.

IGLESIAS, M.; SALINERO, C.; VELA, P.; SAINZ, M. 2008. *Potencial de enraizamiento en la propagación por estaquillas de cultivares antiguos y comerciales de Camellia japonica L.* Departamento de Producción Vegetal, Universidad de Santiago de Compostela, Lugo, 6 pp.

IMBERNÓN, A. 2000. Mejora de las técnicas de propagación sexual y vegetativa de la alcaparra (*Capparis spinosa* L.). Trabajo fin de carrera, Universidad Politècnica de València.

INADA, S., SHIMMEN, T. (2000). Regulation of elongation growth by gibberellin in root segments of *Lemna minor*. *Plant Cell Physiology*, 41:932-939.

INOCENCIO, C.; RIVERA, D.; OBÓN, M. C.; ALCARAZ, F.; BARREÑA, J. A. 2006. A systematic revision of *Capparis* section *Capparis* (Capparaceae). *Annals of Missouri Botanical Garden*, 93: 122-149.

ISTA, 2007. International rules for seed testing: adopted at the ordinary meeting 2006, Glattbrugg/Zurich, Switzerland.

ITRIT, Y.; DOWNIE, B.; BENNET, A. B.; BRADFORD, K. J. 1996. A novel exo-polygalacturonase is associated with radicle protrusion in tomato (*Lycopersicon esculentum*) seeds. *Plant Physiology* 111: 752.

JACOBS, M. 1965. The genus *Capparis* (Capparaceae) from the Indus to the Pacific. *Blumea*, 12: 385-541.

JAFRI, S. M. H. 1977. Capparidaceae. In: *Flora of Libya*. Vol. 12 Ali, S.; Jafri, S.; El-Gadi, A. eds. Al-Faatec University, Department of Botany. Libya, Tripoli.

JAIN, S. P.; PURI, H. S. 1984. Ethnomedicinal plants of Jaunsar-Bawar hills, Uttar Pradesh, India. *Journal of Ethnopharmacology*, 12: 213-22.

JAMIL, Y., PERVEEN, R., ASHRAF, M., ALI, Q., IQBAL, M. Y AHMAD, M. R. (2013). He-Ne laser-induced changes in germination, thermodynamic parameters, internal energy, enzyme activities and physiological attributes of wheat during germination and early growth. *Laser Physics Letters*, 10: 045606 (8 pp).

JIANG, H. E.; LI, X.; FERGUSON, D. K.; WANG, Y. F., LIU, C. J.; LI, C. S. 2007. The discovery of *Capparis spinosa* L. (Capparidaceae) in the Yanghai tombs (2800 years B.P.), NW China, and its medicinal implications. *Journal of Ethnopharmacology*, 113: 409-420.

JASSEN, A. P., 2014. *Scripture and Law in the Dead Sea Scrolls*. Cambridge University Press. New York, USA.

JIMÉNEZ, A. 1987. A new species of caper. *Isozyme Bulletin*, 20: 28.

JIMÉNEZ; C; MATÍAS, L. 2010. La sexualidad en las plantas. *Revista Digital Universitaria*, 11(8): 3-10.

JORDÁN, M.; CASARETTO, J. 2006. *Hormonas y Reguladores del Crecimiento: Auxinas, Giberelinas y Citocininas*. Fisiología Vegetal. Universidad de La Serena, Chile.

JORDANO, D.; RETAMOSA, E. C.; FERNÁNDEZ, J. 1991. Factors facilitating the continued presence of *Colotis evagore* (Klug, 1829) in southern Spain. *Journal of Biogeography*, 18: 637-646.

JUDD, W. S.; CAMPBELL, C. S.; KELLOGG, F. A.; STEVENS, P. F. 1999. Brassicales. In: *Plant systematics: A phylogenetic approach*. Sinauer Associates, Sunderland, MA.

JUDD, W. S.; SANDERS, W.; DONOGHUE, M. J. 1994. Brassicales. In: Angiosperm family pairs: preliminary phylogenetic analyses. Harvard Papers in Botany, 5: 1-51.

JUSTICE, O. L.; BASS, L. N. 1979. *Principles and practices of seed storage*. Castle House Publications, London, UK.

KAN, Y.; KIURAK, N.; KAN, A. 2002. The effect of some regulators on the rooting of caper (*Capparis ovata* Desf. Var. *canescens* (cross) Heywood) cutting. Suleyman Demirel University, Agriculture Faculty Research, 16:56-58.

KATARIA, M.; SINGH, N. 1997. Hepatoprotective effect of Liv.52 and kumaryasava on carbón tetrachloride induced hepatic damage in rats. Indian Journal of Experimental Biology, 35 : 655-657.

KAZAZ S.; ERBA, S.; BAYDAR, H. 2010. Breaking seed dormancy in oil rose (*Rosa damascene* Mill.) by microbial inoculation. African Journal of Biotechnology, 9: 6503-6508,

KENNY, L. 1995. Compte rendu de la journée d'étude sur le câprier et le cactus. In: *Le câprier (Capparis spinosa L.)*. Institut Agronomique et Vétérinaire Hassan II: 12-28.

KENNY, L. 1995. Compte rendu de la journée d'étude sur le câprier et le cactus. p. 12-28 In: *Le câprier (Capparis spinosa L.)*. Institut Agronomique et Vétérinaire Hassan II: 12-28.

KHAN, A. A. 1980/81. Hormonal regulation of primary and secondary seed dormancy. Israel Journal of Botany, 29 : 207-224.

KHANINEJAD, S.; HESSAM AREFI, I. ; KAFI, M. 2012. Effect of priming dormancy breaking seedling establishment of caper (*Capparis spinosa L.*). International Conference on Applied Life Sciences: 365-370.

KHOSHKHUI, M. 1996. *Plant propagation : principles and methods*. 3^a edición. University Publication, Shiraz.

KLIEWER, W.; SOLEIMANI, A. 1972. Effect of chilling on budbreak in 'Thompson seedless' and 'Carignane' grapevines. *American Journal of Enology and Viticulture*, 23: 31-34.

KOPER, R., PODLEŚNY, J. 1999. Effect of pre-sowing laser biostimulation of white lupine seed on mechanical properties of crop yield. *Inżynieria Rolnicza*, 2:21-28.

KUCERA, B.; COHN, M. A.; LEUBNER-METZGER, G. 2005. Plant hormone interactions during seed dormancy release and germination. *Seed Science Research*, 15: 281–307.

KULKARNI, M. G.; STREET, R. A.; VAN STADEN, J. 2007. Germination and seedling growth requirements for propagation of *Dioscorea dregeana* (Kunth) Dur. and Schinz — A tuberous medicinal plant. *South African Journal of Botany*, 73:131–137.

KUMAR, R.; SINGH, S.; SINGH, O. V. 2008. Bioconversion of lignocellulosic biomass: biochemical and molecular perspectives. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 35: 377-391.

LANG, G. A. 1987. Dormancy: a new universal terminology. *HortScience*, 22: 817-820.

LANG, G. A., EARLY, J. D.; MARTIN, G. C.; DARNELL, R. L. 1987. Endo-, para-, and ecodormancy: physiological terminology and classification for dormancy research. *HortScience*, 22: 371-377.

LANSKY, E. P.; PAAVILAINEN, S. L.; LANSKY, S. 2014. *Caper. The Genus Capparis*. CRC Press. New York.

LARUE, C. 1941. *The effects of wounding and wound hormones on root formation*. Departamento de Botánica. Michigan.

LATSAGUE, M.; SAEZ, P.; HAUENSTEIN, E. 2008. Induction of rooting in cuttings of *Berberidopsis corallina* with indol butyric acid. *Bosque*, 29: 227-230.

- LATSAGUE, M.; SAEZ, P.; YÁÑEZ, J. 2009. Efecto del ácido indolbutírico en la capacidad rizogenética de estacas de *Eucryphia glutinosa*. *Bosque*, 30: 102-105.
- LAUBE, J.; SPARKS, T. H.; ESTRELLA, N.; HÖFLER, J.; ANKERST, D. P.; MENZEL, A. 2014. Chilling outweighs photoperiod in preventing precocious spring development. *Global Change Biology*, 20: 170-182.
- LEBRUN, A.; TOUSSAINT, A.N.; ROGGEMANS, J. 1998. Description of *Syzygium paniculatum* Gaertn and its propagation by stem cuttings. *Scientia Horticulturae*, 75: 103-111.
- LEE, J.Y.; KIM, Y. C.; KIM, S. T.; GI G. Y. 2010. Study on Increasing Rose Seed Germination. *Acta Horticulturae*, 855: 183-188.
- LEIST, N.; KRÄMER S.; JONITZ A. 2003. ISTA Working sheets on Tetrazolium testing. Volume II. ISTA, Bassersdorf, CH-Switzerland.
- LEUBNER-METZGER, G.; FRÜNDT, C.; VOGELI-LANGE', R.; MEINS, F. Jr. 1996. Effects of gibberellins, darkness and osmotica on endosperm rupture and class I β -1,3-glucanase induction in tobacco seed germination. *Planta*, 199:282-288.
- LEVIZOU, E.; DRILIAS, P.; KYPARISSIS, A. 2004. Exceptional photosynthetic performance of *Capparis spinosa* L. under adverse conditions of Mediterranean summer. *Photosynthetica*, 42: 229-35.
- LI VIGNI, I.; MELATI, M.R. 1999. Examples of seed dispersal by entomochory. *Acta Bot. Gallica*, 146: 145-156.
- LINKIES, A.; LEUBNER-METZGER, G. 2012. Beyond gibberellins and abscisic acid: how ethylene and jasmonates control seed germination. *Plant Cell Reports*, 31: 253-270.
- LIOTTA, G. 1977. *Acalles barbarus* Lucas (s.l.) su *Capparis spinosa* L. a Pantelleria (Col. Curculionidae). Nota bio-etologica. *Naturalista Sicil.*, 1: 39-45.

LO BOSCO, F. 2017. Evaluation of antioxidant properties and assessment of genetic diversity of *Capparis spinosa* cultivated in Pantelleria Island. Tesis doctoral. Università Degli Studi di Palermo (Italia)/Universitat Politècnica de València (España).

LONGO, S. 1996. La mosa del cappero. *L'Informatore Agrario*, 52: 65-69.

LONGO, S.; SISCARO, G. 1989. Notes on behaviour of *Capparimyia savastanoi* (Martelli) (Diptera, Tephritidae) in Sicily. In: CARVALLO, R. (ed.). *Fruit flies of economic importance.*'87 Proc. CEC/IOBC International Symposium (Rome). Commission of the European Communities, Rotterdam.

LÓPEZ ENCINA, C. Protoplastos. Consultado 23/03/2017. <http://www.encuentros.uma.es/encuentros34/protop34.html>.

LÓPEZ, A.; ROSALES, I.; JIMENEZ, A.; PASCUAL, L. 1988. Variabilidad genética y relaciones evolutivas entre variedades de alcaparra. *Boletín del Instituto de Estudios Almerienses. Ciencia*, 8: 85-115.

LÓPEZ-BUCIO, J.; PELAGIO-FLORES, R.; HERRERA-ESTRELLA, A. 2015. *Trichoderma* as biostimulant: exploiting the multilevel properties of a plant beneficial fungus. *Scientia Horticulturae*, 196: 109-123.

LOZANO, J. 1977. El alcaparro. Hojas divulgadoras. Ministerio de Agricultura, Madrid.

LUNA, F.; PÉREZ, M. 1985. *La tapenera o alcaparra*. Publicación del Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación, Madrid.

MACCHIA, M.; CASANO, S. 1993. The propagation of caper (*Capparis spinosa* L.). *Sementi Elette*. 39:39-42.

MAHMOOD, K.; CAREW, J. G.; HADLEY, P.; BATTEY, N. H. 2000. The effect of chilling and post-chilling temperatures on growth and flowering of sweet cherry (*Prunus avium* L.). *The Journal of Horticultural Science and Biotechnology*, 75: 598-601.

- MAJORAMA, G. 1970. La reticolatura fogliare del Capperò: una malattia associate ad un virus del gruppo S della patata. *Phytopathologia Mediterranea*, 9: 106-109.
- MALLOR, C.; PALLARES, J.; SALAS, M. 2012. Las alcaparras en Aragón: recuperación de una tradición en Ballobar (Huesca), en: *Naturaleza aragonesa*, 29: 44-50.
- MALLOR, C.; ESTOPAÑAN, G.; BURILLO, J. 2016. *Las alcaparras autóctonas de Ballobar (Huesca): producción y evaluación de su calidad*, Zaragoza, 10 pp.
- MAPAMA (Ministerio de Agricultura y Pesca, Alimentación y Medio Ambiente). 2017. Capítulo 13, la alcaparra. Anuario de estadística 2016. Madrid.
- MARONEK, D.; STUDEBAKER, D.; CLOUD, M.; BLACK, U.; JEAN, R. 1983. Stripping vs. Nonstripping on rooting of cutting. Grower results. *International Plant Propagator's Society*, 33: 388-396.
- MAROTO, J. V. 2002. *Horticultura herbácea especial*. 5ª edición. Mundi-Prensa, Madrid.
- MAROTO, J. V. 2014. *Historia de la Agronomía*. Mundi-Prensa, Madrid.
- MARTIALIS, M. V. *Epigrammata ad códices parisinos*. Ed. 1825. París. Francia.
- MASCARÓS, S. 2010. Experimentos para la mejora de la propagación sexual de la alcaparra (*Capparis spinosa*, L.). Trabajo fin de carrera. ETSIA-UPV, València.
- MASSA, J. 1987. Cómo hacer una plantación de tapenera. Servicio de Extensión Agraria. H.D. 4/84. Consejería de Agricultura, Ganadería y Pesca de Murcia, Murcia.

MASSA, J.; LUNA, F. 1985. Cuidados de cultivo a la tapenera. Servicio de Extensión Agraria, H.D. 3/85. Consejería de Agricultura, Ganadería y Pesca de Murcia.

MASTOURI, F., BJÖRKMAN, T.; HARMAN, G. E. 2010. Seed treatment with *Trichoderma harzianum* alleviates biotic, abiotic, and physiological stresses. *Phytopathology*, 100: 1213-1221.

MATTIOLI, P. A. *De Plantis Epitome utilifisima*. Ed 1586. Francofurti ad moenum.

MAYER, N.; PEREIRA, F. 2004. Effect of wounds applied to the bases of herbaceous cuttings on the rooting of four japanese apricot clones (*Prunus mune sieb. et zucc*) in an intermittent mist system. *International Symposium on Rootstocks for Deciduous Fruit Tree Species*, 658: 655-659.

MEGÍAS, M. 2015. *Atlas de histología vegetal y animal*. Universidad de Vigo, Vigo.

MELGAREJO, P. 2000. La tapenera. En: *Tratado de fruticultura para zonas áridas y semiáridas*. Vol. I: *El medio ecológico, la higuera, el alcaparro y el nopal*. Editorial Mundi-Prensa, Madrid: 225-296.

MITCHELL, J. C. 1974. Contact dermatitis from plants of the caper family, Capparidaceae. Effects on the skin of some plants which yield isothiocyanates. *British Journal of Dermatology*, 91: 13-20.

MOHALLEMI, N.; CHEHRAZI, M. 2004. Effect of auxin on rhizogenesis of leafy and leafless cutting of *Bougainvillea spectabilis* in plastic tunnel (In Persian). *Agricultural Scientific Journal*, 27: 127-137.

MOHAMMED, M. S.; KHALID, H.S.; MUDDATHIR, A.; EL TAHIR, K.; KHAN, A. A.; ABD ALGADIR, H.; OSMAN, W. J. A.; SIDDIQUI, N. A. 2015. Effect of some plants' extracts used in Sudanese folkloric medicines on carrageenan-induced inflammation. *Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences*, 28: 159-165.

MOORE, R. P. 1985. *Manual de ensayos al tetrazolio*. Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación, Madrid.

MORENO, A. 2000. Propagación vegetativa de la alcaparra (*Capparis spinosa*, L.). Trabajo final de carrera, Universitat Politècnica de València.

MORPETH, D. R.; HALL, A. M. 2000. Microbial enhancement of seed germination in *Rosa corymbifera* 'Laxa'. *Seed Science Research*, 10: 489–494.

MUSALLAM, I.; DUWAYRI, M.; SHIBLI, R. 2010. Micropropagation of caper (*Capparis spinose* L.) from wild plants. *Functional Plant Science Biotechnology*, 5: 17-21.

MUSZYŃSKI, S.; GŁADYSZEWSKA, B. 2008. Representation of He–Ne laser irradiation effect on radish seeds with selected germination indices. *Institute of Agrophysics*, 22:151–157.

NAVARRO, D. 2016. Análisis de posibles factores que anulan la germinación de un lote de semilla comercial de alcaparra (*Capparis spinosa* L.). Trabajo Final de Grado. Universitat Politècnica de València València.

NEGBI, M.; RUSHKIN, E.; KOLLER, D. 1966. Dynamic aspects of water-relations in germination of *hirschfeldia incana* seeds. *Plant and Cell Physiology*. 7: 363-376.

NIETO-JACOBO, M. F.; STEYAERT, J. M.; SALAZAR-BADILLO, F. B.; VI NGUYEN, D.; ROSTÁS, M.; BRAITHWAITE, M.; DE SOUZA, J. T.; JIMENEZ-BREMONT, J. F.; OHKURA, M.; STEWART, A.; MENDOZA-MENDOZA, A. 2017. Environmental growth conditions of *Trichoderma* spp. affects indole acetic acid derivatives, volatile organic compounds, and plant growth promotion. *Frontiers in Plant Science*, 8, Article 102 (18 pp).

NOSTI, M.; DE CASTRO, R. 1987. Los constituyentes de las alcaparras y su variación con el aderezo. *Grasas y Aceites*, 38: 173-5.

NWACHUKWU, I. D.; SLUSARENKO, A. J.; GRUHLE, M. C. 2012. Sulfur and Sulfur compounds in plant defence. *Natural Product Communications*, 7: 395-400.

OLIVEIRA, A. F. M.; MEIRELLES, S. T.; SALATINO, A. 2003. Epicuticular waxes from caatinga and cerrado speceis and their efficiency agains wáter loss. *Anais da Academia Brasileira de Ciencias*, 75: 431-9.

OLIVER, D. 1868. Capparidaceae. In: *Flora of Tropical Africa*. Vol. 1. D. Oliver et al., eds. Reeve, London.

OLIVIER DE SERRES. 1608. *Le theatre d'agriculture*. La maison rustique, París, Francia.

OLMEZ, Z.; GOKTURK, A.; GULCU, S. 2006. Effects of cold stratification on germination rate and percentage of caper (*Capparis ovata* Desf.) seeds. *Jornal of Environmental Biology*, 27: 667–670.

OROZCO-SEGOVIA, A.; MÁRQUEZ-GUZMAN, J.; SÁNCHEZ – CORONADO, M. E.; GAMBOA DE BUEN, BASKIN, J. M.; BASKIN, C. C. 2007. Seed Anatomy and Water Uptake in relation to seed dormancy in *Opuntia tomentosa* (Cactaceae, Opuntioideae). *Annals of Botany*, 99: 581-592.

ORPHANOS, P. I. 1983. Germination of caper (*Capparis spinosa* L.) seeds. *Journal of Horticultural Science*, 58: 267-270.

ORTEGA, N.; BUSTO, M. D.; PÉREZ-MATEOS, M. 2001. Kinetics of cellulose saccharification by *Trichoderma reesei* cellulases. *International Biodeterioration & Biodegradation* 47: 7-14.

ÖZCAN, M. 1999. Pickling and storage of caperberries (*Capparis* spp.). *Zeitschrift für lebensmitteluntersuchung und-Forschung A*, 208: 379-382.

ÖZCAN, M.; AKGÜL, A. 1999. Storage quality in different brines of pickled capers (*Capparis* spp.). *Grasas y Aceites*, 50: 269-274.

ÖZDEMİR, F.; ÖZTÜRK, M. 1996. Studies on the autecology of *Capparis* species distributed in West Anatolia. Turkish Journal of Botany, 20: 117-125.

PARÉ, A. *Ouvres completes d'Ambroise Paré*. Edición de 1840. J.B. Baillière, París. Francia

PARK, E. Y.; IKEDA, Y.; OKUDA, N. 2002. Empirical evaluation of cellulase on enzymatic hydrolysis of waste office paper. Biotechnology and Bioprocess Engineering, 7: 268-274.

PARK, E. Y.; MICHINAKA, A.; OKUDA, N. 2001. Enzymatic hydrolysis of waste office Paper using viscosity as operating parameter. Biotechnology Progress, 17: 379-382.

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.; PASCUAL-SEVA, N.; SAN BAUTISTA, A., CASTELL, V. 2017. Propagación de plantas. Universitat Politècnica de València, València.

PASCUAL, B.; SAN BAUSTISTA, A.; FERREROS, N.; LOPEZ-GALARZA, S.; MAROTO, J. V. 2003. Analysis of germination of caper seeds as influenced by the position of fruit on the mother plant, fruit maturation stage and fruit weight. Journal of Horticultural Science and Biotechnology, 78: 73–78.

PASCUAL, B.; SAN BAUTISTA, A.; IMBERNÓN, A.; LÓPEZ, S.; ALAGARDA, J.; MAROTO, J. 2004. Seed treatments for improved germination of caper (*Capparis spinosa*). Seed Science and Technology, 32: 637-642.

PASCUAL, B.; SAN BAUTISTA, A.; LÓPEZ-GALARZA, S.; ALAGARDA, J.; MAROTO, J. V. 2006 a. Intact fruit of caper (*Capparis*

spinosa) is an improved seed propagation method. *Acta Horticulturae*, 782: 107-114.

PASCUAL, B.; SAN BAUTISTA, A.; LÓPEZ-GALARZA, S.; ALAGARDA, J.; MAROTO, J. 2006 b. Germination behavior after storage of caper seeds. *Seed Science and Technology*, 34: 151-159.

PASCUAL, B.; SAN BAUTISTA, A.; PASCUAL-SEVA, N.; GARCÍA, R.; LÓPEZ, S.; MAROTO, J. 2008. Estudio del enraizamiento de estaquillas de madera suave en alcaparra (*Capparis spinosa*, L.). *Actas de horticultura*, 50: 89-93.

PASCUAL, B.; SAN BAUTISTA, A.; PASCUAL-SEVA, N.; GARCIA MOLINA, R.; LOPEZ-GALARZA, S.; MARORO, J. V. 2009. Effects of soaking period and gibberellic acid addition on caper seed germination. *Seed Science and Technology*, 37: 33-41.

PASCUAL-SEVA, N.; SAN BAUTISTA, A.; LOPEZ-GALARZA, S.; MAROTO J. V.; PASCUAL, B. 2009. Effect of Accelerated Ageing on Germination in Caper (*Capparis spinosa* L.). Seeds. In V International Symposium on Seed, Transplant and Stand Establishment of Horticultural Crops, 898: 69-74.

PENNINGTON, T. D.; REYNEL, C.; DAZA, A. 2004. *Illustrated guide to the trees of Peru*. David Hund Publishers. Sherborne, UK.

PENTANIDOU, T.; VAN LAERE, A. J.; SMETS, E. 1996. Change in floral nectar components from fresh to senescent flowers of *Capparis spinosa* (Capparidaceae), a nocturnally flowering Mediterranean shrub. *Plant Systematics and Evolution*, 199: 79-92.

PÉREZ, J. 2008. *Factibilidad técnico - económica del cultivo de alcaparras en el Partido de Villarino*. Tesis de Magister en Economía Agraria y Administración Rural. Universidad Nacional del Sur, Argentina, 81 pp.

- PÉREZ, J.; RODRIGUEZ, V. 2012. *Control de cierres en conservas*. Editado por JUNTA DE ANDALUCÍA. Instituto de Investigación y Formación Agraria y Pesquera, Córdoba.
- PERRY, D.A. 1984. Manual de métodos de ensayos de vigor. Instituto Nacional de Semillas y Plantas de Vivero, Madrid.
- PILONE, N. 1990. Variazione del potenziale rizogeno naturale nel capperò. *L'Informatore Agrario*, 46: 69-70.
- PITTAWAY, A. R. 1979. The butterflies and hawk-moths of eastern Saudi Arabia. *Proceedings and the British Entomological and Natural History Society*, 12: 90-101.
- PITTAWAY, A. R. 1980. Butterflies (Lepidoptera) of Qatar. April-june, 1979. *Entomologist's gazette*, 31: 103-111.
- PITTAWAY, A. R. 1981. Further notes on the butterflies and hawkmoths (Lepidoptera) of eastern Saudi Arabia. *Entomologist's Gazetter*, 32: 27-35.
- PITTAWAY, A. R. 1985. Lepidoptera: Rhopalocera of western Saudi Arabia. *Fauna of Saudi Arabia*, 7: 172-192.
- PLATINA, B. *De Honesta Voluptate et Valetudine. Libri decem*. Ed. 1537. Coloniae ex officina Euchajj Ceruicorni.
- PLINII SECUNDI, C. *Naturalis historiae*. Edición de 1669. Archiepifcopi Parifienfis Typographum, Parisiis.
- PODLEŚNY, J. 2007. The effect of seed irradiation with laser and plant desiccation on yielding and quality features of white lupine seeds. *Acta Agrophysica*, 9: 733-745.
- PODLEŚNY, J.; STOCHMAL, A.; PODLEŚNA, A.; MISIAK, L. E. 2012. Effect of laser light treatment on some biochemical and physiological processes in seeds and seedlings of white lupine and faba bean. *Plant Growth Regulation*, 67(3): 227-233.

PRIESTLEY, D. A. 1986. Seed aging. Comstock Publishing Associates. Ithaca, New York, USA.

PROBERT, R. J.; LININGTON, S.H. 2006 b. Viability. p. 740. In: BLACK, M.; BEWLEY J. D.; HALMER P. (eds.). *The encyclopedia of seeds, science, technology and uses*. CABI, Trowbridge, U.K.

PROBERT, R. J.; LININGTON, S. H. 2006 a. Sorption isotherms. p. 643. In: BLACK, M.; BEWLEY J. D.; HALMER P. (eds.). *The encyclopedia of seeds, science, technology and uses*. CABI, Trowbridge, U.K.

PROŚBA-BIAŁCZYK, U., SZAJSNER, H., GRZYOE, E., DEMCZUK, A., SACAŁA, E., BAŁK, K. 2013. Effect of seed stimulation on germination and sugar beet yield. *International Agrophysics*, 27: 195-201.

PSARAS, G. K.; SOFRONIOU, I. 1999. Wood anatomy of *Capparis spinosa* from an ecological perspective. *Iawa Journal*, 20: 419-429.

PSARAS, G. K.; DIAMANTOPOPULUS, G.S.; MAKRYPOULIAS, C. 1996. Chloroplast arrangement along intercellular spaces. *Israel Journal of Plant Sciences*, 44: 1-9.

PUGNAIRE, F. I.; ESTEBAN, E. 1991. Nutritional adaptations of caper shrub (*Capparis ovata* Desf.) to environmental stress. *Journal of Plant Nutrition*, 14:151-166.

RAE (Real Academia Española). *Diccionario de la lengua española*; Edición del tricentenario.

RAHNAVARD, R.; RAZAVI, N. 2016. A review on the medical effects of *Capparis spinosa* L. *Advanced Herbal Medicine*, 2: 44-53.

RAJESH, P.; SELVAMANI, P.; LATHA, S.; SARASWATHY, A.; KANNAN, V. R. 2009. A review on chemical and medicobiological applications of capparidaceae family. *Pharmacognosy Review*, 3: 378-387.

RAMENANI, M.; JAAFAR, M.; SHEKALANDEH, A.; SALEHI, H.; TAGHVAEI, M. y JAMI, M. 2008. A comparison of different propagation

methods of common Caper-bush (*Capparis spinosa* L.) as a new horticultural crop. International Journal of Plant Developmental Biology: 107-110.

RAMEZANI-GASK, M., BAHRANI, M. J., SHEKAFANDEH, A., SALEHI, H., TAGHVAEI, M., AL-AHMADI, M. J. 2008. A comparison of different propagation methods of common caper-bush (*Capparis spinosa* L.) as a new horticultural crop. International Journal of Plant Developmental Biology, 2:106-110.

RANKEN, M. D. 2012. *Food industries manual*. Springer Science & Business Media.

RAO, T. A.; DAS, S. D. 1978. Idioblasts typology on the taxonomy of *Capparis spinosa* complex. Current Science Association, 47: 917-919.

RECHE, J. 1967. Cultivo de la alcaparra o tapenera. Ministerio de agricultura, 15 pp.

RHIZOPOULOU, S.; PSARAS, G. K. 2003. Development and Structure of Drought-tolerant Leaves of the Mediterranean Shrub *Capparis spinosa* L. Annals of Botany, 92: 377-383.

RHIZOPOULOU, S.; HERBERLEIN, K.; KASSIANOU, A. 1997. Field water relations of *Capparis spinosa* L. Journal of Arid Environments, 36 : 237-248.

RIBEIRO, M. 1993. Ensayo de enraizamiento de estaquillas del alcornoque (*Quercus suber* L.). En: Congreso Forestal Español, Lourizán- Ponencias y comunicaciones. Pontevedra: 233-238.

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: 82-188.

RITAMBHARA, S., GIRJESH, K. 2013. Biostimulating effect of laser beam on the cytomorphological aspects of *Lathyrus sativus* L. Annals of Plant Sciences, 2:141-148.

ROBERTS, E. H. 1960. Viability of cereal seed in relation to temperature and moisture. *Annals of Botany*, 24: 12-31.

ROBERTS, E. H. 1972. Storage environment and control of viability. p. 14-58. In: ROBERTS E. H. (ed.). *Viability of seeds*. Chapman and Hall, London.

RODMAN, J. E. 1991 a. A taxonomic analysis of glucosinolate-producing plants. Part 1: Phenetics. *Systematic Botany*, 16: 598-618.

RODRIGO, M.; LAZARO, M. J.; ALVARRUIZ, A.; GINER, V. 1992. Composition of capers (*Capparis spinose*): influence of cultivar, size and harvest date. *Journal of Food Science*, 57: 1152-1154.

ROMOLI, D. 1560. *La Singolare dottrina*. Edición 1587. Venezia.

RONDAM, J. E.; PRICE, R. A.; KAROL, K.; CONTI, E.; SYTSMA, K. J.; PALMER, J. D. 1993. Nucleotide sequences of the *rbcL* gene indicate monophyly of mustard oil plants. *Annals Missouri Botanical Garden*, 80: 686-699.

RONG, H., XUNLING, W., MING, Y. 2002. Influence of He-Ne laser irradiation on the excision repair of cyclobutyl pyrimidine dimers in the wheat DNA. *Chinese Science Bulletin*, 47: 18-821.

ROSA, E. A. S.; HEANEY, R. K.; FENWICH, G. R.; PORTAS, C. A. M. 1997. Glucosinolates in crop plants. *Horticultural reviews*, 19: 99-215.

ROSSENDO, D. 2008. Alcaparras afrodisiacas en las viejas murallas. *El periódico* (6 septiembre 2018).

ROY, A.; SONI, G. R.; KOLHAPURE, R. M.; KARNIK, U. R.; PATKI, P. S. 1994. Down regulation of tumour necrosis factor activity in experimental hepatitis by a herbal formulation, *Liv.52*. *Indian Journal of Experimental biology*, 32: 694-697.

RUBIO, M. B.; HERMOSA, R.; VICENTE, R.; GÓMEZ-ACOSTA, F. A.; MORCUENDE, R.; MONTED, E.; BETTIOL, W. 2017. The combination of *Trichodrema harzianum* and chemical fertilization leads to the deregulation of phytohormone networking, preventing the adaptive responses of tomato plants to salt stress. *Frontiers in Plant Science*, 8, Article 294 (14 pp).

RUIZOPOULUS, S. ; PSARAS, G. K. 2003. Development and structure of drought-tolerant leaves of the Mediterranean shrub *Capparis spinosa* L. *Annals of Botany*, 92 : 377-383.

SAIFI, N.; IBIJBIJEN, J.; ECHCHGADDA, G. 2013. *In vitro* propagation via seeds of *Capparis ovata* Desf. *African Journal of Biotechnology*, 12: 3235-3238.

SALEM, B.; ZEMNI, H.; GHORBEL, A. 2001. Propagation of Caper (*Capparis spinosa* L.) by herbaceous cuttings and *in vitro* culture. *Agricultura Mediterranea*, 131: 42-48.

SAMISH, R. M. 1954. Dormancy n Woody Plants. *Annual Review of Plant Physiology*, 5: 183-204.

SAN BAUTISTA, A.; PASCUAL, B.; SOSPEDRA. S.; LÓPEZ-GALARZA, S.; LAZA, P.; MAROTO, J. V. 2006. Influencia de la fecha y de la sección de las ramas en el enraizamiento y la brotación de las yemas en estaquillas de alcaparra. *Actas de Horticultura*, 46: 41-45.

SÁNCHEZ, A. H.; DE CASTRO, A.; REJANO, L. 1992. Controlled fermentation of caperberries. *Journal of Food Science*, 57: 675-678.

SÁNCHEZ, M.; JUSTO, J. 1997. *Effect of IBA and substrate temperature for adventitious roots formation in five species of ornamental coniferae*. Colegio de Postgraduados de Montecillo. Mexico. 80 pp.

SÁNCHEZ, R. A; DE MIGUEL, L. 1997. Phytochrome promotion of mannan-degrading enzyme activities in the micropylar endosperm of *Datura*

ferox seeds requires the presence of the embryo and gibberellin synthesis. Seed Science Research, 7: 27-34.

SANDHIR, R.; GILL, K. D. 1999. Hepatoprotective effects of Liv.52 on ethanol induced liver damage in rats. Indian Journal of Experimental Biology, 37: 762-766.

SANTELICES, R. 2016. Efecto de la temperatura del substrato sobre el arraigamiento de estacas de canelo (*Drimys winteri* J.R. et G. Forster). Ciencias Forestales, 12: 27-32.

SARKAR, P.; BOSNEAGA, E.; AUER, M. 2009. Plant cell walls throughout evolution: towards a molecular understanding of their design principles. Journal of Experimental Botany, 60: 3615-3635.

SCHMILEWSKI, G. 2009. *Sustratos de cultivo. Composición y tipo de empleo determinan su calidad.* Germany.

SHIRWAIKA, A.; SREENIVASAN, K. K.; KRISHNANAND, B. R.; VASANTH KUMAR, A. 1996. Chemical investigation and antihepatotoxic activity of the root bark of Capparis spinose. Fitoterapia, 67: 200-204.

SH'LITA, M. B. 2004. Leyendas del talmud. Tratado de Shabat II. Editorial Majón Haktav, Jerusalem, Israel.

SINGH, V. K.; GEORGE, C. X.; GUPTA, K. P.; GUPTA, B. M. 1983. Antiviral activity of plant extract Liv.52 in mice experimentally infected with Semliki forest encephalitis virus. Science and Culture, 49: 354-356.

SINGH, D.; SINGH, R. K. 2011. Kair (*Capparis decidua*): a potential thnobotanical wheather predictor and livelihood security shrub for the arid zone of Rajasthan and Gujarat. Indian Journal of Traditional Knowledge, 10: 146-155.

SINGH, P.; MISHRA, G., SANGEETA, S., JHA, K. K.; KHOSA, R. L. 2011. Traditional uses, phytochemistry and pharmacological properties of *Capparis decidua*: an overview. Pharmaceutical Letter, 3: 71-82.

SITRIT, Y.; DOWNIE, B.; BENNET, A. B.; BRADFORD, K. J. 1996. A novel exo-polygalacturonase is associated with radicle protrusion in tomato (*Lycopersicon esculentum*) seeds. *Plant Physiology* 111: 752.

SOLER, S. G. 1973. La alcaparra: Características y comercialización. *Agricultura: Revista agropecuaria*, 495: 422-425.

SOSPEDRA, S. 2005. Estudio de la propagación vegetativa de la alcaparra. Trabajo Fin de Carrera, Universitat Politècnica de València, València.

SÖYLER, D.; ARSLAN, N. 2000. Kebere (*Capparis spinosa* L.) çeliklerinin köklenmesi üzerine bazı büyüme düzenleyici maddelerin etkileri. *Turkish Journal Agricultural Forestry*, 24: 595-600.

SOZZI, G. O. 2001. Caper bush: botany and horticulture. *Horticultural Reviews*, 27: 125-188.

SOZZI, G. O; CHIESA, A. 1995. Improvement of caper (*Capparis spinosa* L.) seed germination by breaking seed coat-induced dormancy. *Scientia Horticulturae*, 62: 255-261.

STATPOINT TECHNOLOGIES INC. 2013. STATGRAPHICS Centurion XVI. Warrenton, Virginia, USA.

STILL, D. W.; BRADFORD, K. J. 1997. Endo-P-mannanase activity from individual tomato endosperm caps and radicle tips in relation to germination rates. *Plant Physiology*, 113: 21-29.

SUJA, V.; LATHA SHARMILA, S.; SHYAMALA DEVI, C. S. 1997. Protective effect of Liv.52 and Liv.100, ayurvedic formulations on lipid peroxidation in rat liver homogenate: An *in vitro* study. *Indian Journal of Experimental Biology*, 35: 50-52.

SULEIMAN, M.; RAMACHANDRA, N.; SHEENA, J.; RACHEL, R. 2012. Effect of Rooting Hormones (IBA and NAA) on Rooting of Semi Hardwood Cuttings of *Capparis spinosa*. *Journal of Agriculture and Biodiversity Research*, 1: 135-139.

TAIZ, L., 2010. Plant physiology 5th ed. Sinauer Associates. Sunderland, Massachusetts, USA.

TALAVERA, S.; CASTROVIEJO, S. 1999. *Flora Iberica: Plantas vasculares de la Peninsula Iberica e Islas Baleares. Vol. 1.* Editorial CSIC-CSIC Press.

TANSI, S. 1999. Propagation methods for caper (*Capparis spinosa* L.) seeds. *Agricoltura Mediterranea*, 23: 45-49.

TÉLLEZ VARGAS, J.; RODRÍGUES-MONROY, M.; LÓPEZ MEYER, M.; MONTES-BELMONT, R.; SEPÚLVEDA-JIMÉNEZ, G. 2017. *Trichoderma asperellum* amelioratews phytotoxic effects of copper in onion (*Allium cepa* L.). *Environmental and Experimental Botany*, 136: 85-93.

TESORIERE, L.; BUTERA, D.; GENTILE, C.; LIVREA, M.A. 2007. Bioactive camponents of Caper (*Capparis spinose* L.) from Sicily and antioxidant effects in a Red Meat Simulated gastric digestion. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55: 8465-8471.

THABREW, M. I.; EMEROLE, G. O.; SUBBARAO, V. V. 1982. Effect of Liv.52 on carbon tetrachloride-induced changes in hepatic microsomal drug.metabolizing enzymes of the rat. *Toxicology Letters*, 14: 183-188.

THOMPSON, W. K.; JONES, D. L.; NICHOLS, D. G. 1975. Effects of dormancy factors on the growth of vegetative buds of young trees. *Australian Journal of Agricultural Research*, 26: 989-996.

TLILI, N.; KHALDI, A. ; TRIKI, S. ; MUNNÉ-BOSCH, S. 2010. Phenolic compounds and vitamin antioxidants of caper (*Capparis spinosa*). *Plant Foods Hum Nutr*, 65: 260-265.

TLILI, N.; ELFALLEH, W.; SAADAOU, E.; KHALDI, A.; TRIKI, S. ; NASRI, N. 2011. The (*Capparis* L.): Ethnopharmacology, phytochemical and pharmacological properties. *Fitoterapia*, 82: 93-101.

TOOROP, P. E.; BEWLWY, J. D.; HILHORST, W. M. 1996. Endo-[I-mannanase isoforms are present in the endosperm and embryo of tomato seeds, but are not essentially linked not essentially linked to the completion of germination. *Planta*, 200: 151-158.

TRENOR, F.; RODRIGUEZ, J.; ABALLE, M.; LOPEZ, F.; MARTIN, J.; DURAN, A.; BALAIRON, A.; OCHOA, A. 2014. *La ciencia en el Desarrollo Tecnológico de Envases*. Cursos-Materiales didácticos.

UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA, 2012. Microscopía electrónica de barrido de emisión de campo. Servicio de microscopía electrónica. Universitat Politècnica de València, València.

UNIVERSITY OF TEXAS. 2013. Image Tools for Windows Versión 3.0. University of Texas Health Science Center, San Antonio, Texas, USA.

UPHOF, J. C. Th. 1968. Dictionary of economic plants. 2nd ed. Verlag Von Cramer, New York.

VAN BILSEN, D. G. J. L.; HOEKSTRA F. A. 1993. Decreased membrane integrity in aging *Typha latifolia* L. pollen: accumulation of lysolipids and free fatty acids. *Plant Physiology*, 101: 675–682.

VAN SOEST, P. V.; ROBERTSON, J. B.; LEWIS, B. A. 1991. Methods for dietary fiber, neutral detergent fiber, and nonstarch polysaccharides in relation to animal nutrition. *Journal of Dairy Science*. 74: 3583-3597.

VARELA, R. O.; ALBORNOZ, P. L. 2013. Morpho-anatomy, imbibition, viability and germination of the seed of *Anadenanthera colubrina* var. *cebil* (Fabaceae). *Revista de Biología Tropical (International Journal of Tropical Biology and Conservation)*, 61: 1109-1118.

VERTUCCI, C. W.; ROOS, E. E. 1990. Theoretical basis of protocols for seed storage. *Plant Physiology*, 94: 1019-1023.

VIJAYA PADMA, V.; SUJA, V.; SHYAMALA DEVI, C. S. 1998. Hepatoprotective effect of Liv.52 on antitubercular drug-induced hepatotoxicity in rats. *Fitoterapia*, 69: 520-522.

VILLAR, A.; MELO, E. 2009. Alcaparro, en: *Guía de plantas medicinales del Magreb*. Ediciones cuadernos de la fundación DR. Antonio Esteve, Barcelona, 18: 24-25.

WALTERS, C. 2004. Principles for preserving germoplasm in gene banks. p. 119-138. In: GUERRANT, E.; HAVENS, K.; MAUNDER, M. (eds.). *Ex situ plant conservation: supporting species survival in the wild*. Island Press, Covelo, California, USA.

WALTERS, C. 2005. Water properties and cell longevity. p. 191-204. In: BUERA, P.; WELTI-CHANES, J.; LILLFORD, P.; CORTI, H. (eds.). *Water properties of food, pharmaceutical and biological materials*. CRC Press, Boca Raton, Florida, USA.

WALTERS, C., 2006 a. Deterioration and longevity. p. 137-141. In: BLACK, M.; BEWLEY J. D.; HALMER, P. (eds.). *The encyclopedia of seeds, science, technology and uses*. CABI, Trowridge, U.K.

WALTERS, C. 2006 b. Deterioration reactions, p. 141-143. In: BLACK, M.; BEWLEY J.D.; HALMER P. (eds.). *The encyclopedia of seeds, science, technology and uses*. CABI, Trowbridge, U.K.

WELBAUM, G. E.; BRADFORD, K. J.; YIM, K. O.; BOOTH, D. T.; OLUOCH, M. O. 1998. *Seed Science Research*, 8: 161-172.

WESTWOOD, M. 1973. Growth regulators in the fruit tree nursery. The role of growth regulators in rooting. *Acta horticulturae*, 93: 89-92.

WETTLAUFER S .H; LEOPOLD, A. C. 1991. Relevance of Amadori and Maillard products to seed deterioration. *Plant Physiology*, 97: 165–169.

WILD, H. 1960. Cappariaceae. In: *Exell, A. W. y Wild, H, Eds. Flora zam besiaca*, 1: 194-245.

WILSON, D. O.; MCDONALD, M.B. 1986. The lipid peroxidation model of seed ageing. *Seed Science & Technology*, 14: 269-300.

WU, L.; YAO, D.; MING, L. 2017. Effects of solid matrix priming with *Trichoderma harzianum* on seed germination, seedling emergence and photosynthetic capacity of eggplant. *African Journal of Biotechnology*, 16: 699-703.

XIN, Z. 2012. *Cutting time and concentration on rooting cuttings of Broussonetia papyrifera*. *Science and Technology of Qinghai Agriculture and Forestry*, 3 pp.

XU, X. Y.; MENG, X. D.; GOU, X. M.; WANG, Y. X.; YIN, W. L. y WANG, H. F. 2004. Hardwood cutting of four wild shrubs. *Journal of Northeast Forestry University*, 32: 60-63.

XUE, A. G.; GUO, W.; CHEN, Y.; SIDDIQUI, I.; MARCHAND, G.; LIU, J.; REN, C. 2017. Effect of seed treatment with novel strains of *Trichoderma* spp. on establishment and yield of spring wheat. *Crop Protection*, 96: 97-102.

YAMBE, Y.; TAKENO, K.1992. Improvement of rose achene Germination by treatment with macerating enzymes. *HortScience*, 27: 1018-1020.

YILDIRIM, Z. 1998. Studies on the improvement of seed germination in caper. *Turk Journal of Field Crops*, 3: 1-24.

YILDIRIM, Z.; BAYRAM, E. 2001. Propagation of Caper by seed, cutting or by tissue culture. *Turkish Journal of Field Crops*, 6: 6-13.

ZACARÍAS, L.; LAFUENTE, M. T., 2013. Etileno, ácido abscísico y otros reguladores del desarrollo. p. 425-465. En AZCON-BIETO, J.; TALÓN, M.: *Fundamentos de fisiología vegetal*. Madrid: Mc Graw-Hill.

ZARZA, R. 2003. Estudio para la mejora de la propagación de la alcaparra (*Capparis spinosa* L.). Trabajo fin carrera, Universidad Politècnica de València, València.

ZHANG, H., ZHANG, L., TIDEMAND-LICHTENBERG, P., BUCHHAVE, P., XU, X., LI, Y. 2011. Effect of laser and LED on enzymatic production of ceramide. *Photochemistry and photobiology*, 87:131-136.

ZHANG, M.; TUCKER, G. C. 2008. Capparaceae. In: WU, Z.Y.; RAVEN, P. H.; HONG, D. Y. (eds.). *Flora of China*. Vol. 7. Missouri Botanical Garden Science Press. St. Louis, USA.

ZHANG, S.; HU, D. B.; HE, J. B.; GUAN, K. Y.; ZHU, H. J. 2014. A novel tetrahydroquinoline acid and a new racemic benzofuranone from *Capparis spinosa* L., a case study of absolute configuration determination using quantum methods. *Tetrahedron*, 70: 869-873.

ZOHARY, M. 1960. The species of *Capparis* in the Mediterranean and the Near Eastern countries. *Bulletin of the Research Council of Israel*, 2: 49-64.

ZOHARY, M. 1966. *Flora Palestina*. Part one. Israel Academy of Sciences and Humanities, Jerusalem.

ZOMLEFER, W. B. 1994. Brassicaceae or Cruciferae. In: *Guide to flowering plant families*. University of North Carolina Press, Chapel Hill, North Carolina, USA.