

UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA

ESCOLA TÈCNICA SUPERIOR D'ENGINYERIA
AGRONÒMICA I DEL MEDI NATURAL



ESTUDIO PARA LA MEJORA DE LA GERMINACIÓN DE LAS SEMILLAS DE *CAPPARIS* *SPINOSA* L.

TRABAJO FIN DE GRADO EN INGENIERÍA AGROALIMENTARIA Y DEL MEDIO RURAL

ALUMNO:

Antoine Fernández

TUTORES:

Bernardo Pascual España

Mariano Juan Ferrer

Curso Académico 2014/2015

VALENCIA, septiembre 2015

AGRADECIMIENTOS:

A Dr. Bernardo Pascual España por la dirección académica y experimental que ha conllevado este trabajo. Por su seguimiento y ayuda en la realización del trabajo. Gracias por su apoyo y dedicación.

Al Profesor Mariano Juan Ferrer por la dirección académica y experimental que ha conllevado este trabajo.

A Dra. Nuria Pascual Seva, por ayuda en la realización académica y experimental, del trabajo y por su apoyo y dedicación.

A Charlotte Fernández, por su ayuda en la realización del trabajo y por su apoyo y dedicación. Merci.

A Bolívar Mantilla, por su ayuda en la fase experimental del trabajo, y en realización de las fotografías, su apoyo y por su compañía.

RESUMEN:

La multiplicación de la alcaparra (*Capparis spinosa* L.), tanto sexual como asexual presenta dificultades, siendo la propagación sexual el método más utilizado, aunque los porcentajes de germinación de las semillas suelen ser muy bajos. El grupo de investigación en el que se ha realizado este trabajo, ha trabajado en la mejora de la germinación de las semillas de alcaparro, intentando romper la dureza de las cubiertas, mediante escarificación, y la inhibición fisiológica del embrión. También ha analizado la influencia de determinadas características de los frutos en la germinación de las semillas contenidas en ellos. Con el objetivo de mejorar y estudiar la propagación sexual del alcaparro, se llevaron a cabo cinco experimentos. Con el primero, se trató de mejorar la germinación mediante varios métodos de escarificación (mecánica, térmica y química) y de reblandecimiento de las cubiertas de las semillas. En el segundo se trató de estudiar la germinación en un sustrato de pH ácido y básico, y en un sustrato con un nivel de salinidad alto. En el tercer experimento se estudió la influencia de varias hormonas, una giberelina, una citoquinina (Benzyl-aminopurine) y una auxina (2-4 DP), y de nitrato potásico sobre la germinación de las semillas. En el cuarto experimento, se estudió la influencia de la edad de las semillas sobre su tasa de germinación, se usaron semillas recolectadas en 2010, 2011, 2012, 2013 y 2014. En el quinto y último experimento se comparó la germinación de semillas de distinta procedencia. Como conclusiones se observó que los métodos de reblandecimiento de las cubiertas y de alternancia de humedad mejoraban ligeramente la germinación. También se observó que las semillas parecían germinar mejor en un medio ácido. El AG y las citoquininas demostraron un efecto positivo sobre la germinación. También que la viabilidad de las semillas disminuye con la edad.

Palabras clave:

Alcaparra, botón floral, escarificación, viabilidad, poder germinativo, ácido giberélico, citoquininas,

ABSTRACT

The caper's proliferation (*Capparis spinosa* L.), both sexual and asexual, presents a certain number of difficulties. Although seeds' germination rates are usually rather low, the most commonly used method is the sexual propagation.

The research group that has conducted this study has worked on improving caper seeds' germination through a variety of techniques such as breaking through the hardness of the seed coat, scarification and physiological inhibition of the embryo.

The influence of certain fruits' characteristics on the germination of their own seeds was also part of this study. With the aim of improving and studying caper's sexual propagation, five experiments were carried out. The first was done in order to improve germination through a series of different types of scarification (mechanical, thermal and chemical). Another method used in the same experiment was the softening of the seed coat.

In the second experiment, the goal was to study germination within substrata of acidic and basic pH, as well as within a substratum with a high level of salinity.

The third experiment's aim was to analyze the influence of different hormones — gibberelin, cytokinin (Benzyl-aminopurine) and auxin (2,4- DP) — as well as potassium nitrate, on seeds' germination.

During the fourth experiment, a study was conducted regarding the influence of seeds' age on their germination rates — seeds batches harvested in 2010, 2011, 2012, 2013 and 2014 were used.

In the fifth and last experiment, a comparative study was carried out between seeds' germination of different origins. As for the results of the experiments, the seed coat softening method and the moisture alternation method improved slightly the germination process. It has also been observed that the seeds appeared to germinate with better results in an acidic substratum. The GA, along with the cytokinins, showed a positive effect of their action on the germination process. Finally, it appears that seeds' viability decreases with age.

Key words:

Capparis spinosa, germination, scarification, hormones, gibberellic acid.

Índice

1	Introducción.....	1
1.1	Generalidades.....	1
1.2	Taxonomía.....	1
1.3	Descripción botánica.....	1
1.4	Ciclo vegetativo.....	2
1.5	Adaptación ecológica.....	2
1.6	Uso e importancias.....	2
1.7	Propagación.....	3
1.7.1	Propagación asexual.....	3
1.7.2	Propagación sexual.....	3
1.7.2.1	La semilla.....	4
1.7.2.2	La germinación.....	4
1.7.2.3	Las hormonas giberelinas, citoquininas, compuestos nitrogenados y ABA en la germinación de las semillas.....	5
1.7.2.4	La nascencia.....	5
1.7.2.5	La latencia.....	6
2	Objetivos.....	7
3	Material y métodos.....	8
3.1	Mejora de la germinación mediante escarificación.....	8
3.2	Germinación con distintos tratamientos para modificar el pH y la salinidad del sustrato.....	9
3.3	Germinación bajo la influencia de distintas hormonas y de nitrato potásico.....	10
3.4	Evolución del poder germinativo con la edad de las semillas.....	10
3.5	Poder germinativo de las semillas procedentes de diferente material vegetal.....	10
3.6	Test de viabilidad con tetrazolio.....	11
3.7	Modelo matemático.....	11
3.8	Análisis estadístico.....	11
4	Resultados y discusión.....	12
4.1	Mejora de la germinación mediante escarificación.....	12
4.2	Germinación con distintos tratamientos para modificar el pH y la salinidad del sustrato.....	17
4.3	Germinación bajo la influencia de distintas hormonas y de nitrato potásico.....	22
4.4	Evolución del poder germinativo con la edad de las semillas.....	25
4.5	Poder germinativo de las semillas procedentes de diferente material vegetal.....	29
5	Conclusiones.....	33
6	Bibliografía.....	34

Índice de figuras

Figura 1.- Modelo logístico ajustado de germinación acumulada. Valores medios para los distintos tratamientos de escarificación y aplicación de AG	12
Figura 2. - Modelo logístico ajustados de germinación acumulada. Valores medios para los distintos tratamientos al sustrato, AC (solución de ácido cítrico), AF (solución de ácido fórmico), Cal (solución de pH básico a base de carbonato cálcico) y sal (solución salina) y aplicación de AG	17
Figura 3.- Modelo logístico ajustados de germinación acumulada. Valores medios para las distintas hormonas, giberelina (AG), citoquinina (benzyl-aminopurine) y auxina (2-4 DP) y KNO ₃	22
Figura 4.- Modelo logístico ajustado de germinación acumulada. Valores medios para en ensayo de germinación de distintos años de recolección de las semillas (2010, 2013 y 2014) y aplicación de AG	25
Figura 5.- Modelo logístico ajustado de germinación acumulada. Valores medios del ensayo de germinación para los distintos materiales vegetales (<i>Capparis spinosa</i> subsp <i>rupestris</i> y subsp <i>spinosa</i>) y aplicación de AG	29

Índice de tablas

Tabla 1.- Influencia de distintos métodos de escarificación (Remojo y Alternancia H-S), y de la aplicación de AG, sobre el porcentaje de la germinación acumulada (G, %), de la germinación máxima (A, %), y de los parámetros de germinación, tiempo para alcanzar el 50 % de la germinación (t_{50} , días) y velocidad de germinación ($k/2$, d^{-1})	13
Tabla 2.- Análisis de la viabilidad de las semillas no germinadas al finalizar el ensayo de escarificación, según el test del tetrazolio	14
Tabla 3.- Influencia del tratamiento para modificar el pH y la salinidad del sustrato y de la aplicación de AG, sobre el porcentaje de la germinación acumulada (G, %), de la germinación máxima (A, %), y de los parámetros de germinación, tiempo para alcanzar el 50 % de la germinación (t_{50} , días) y velocidad de germinación ($k/2$, d^{-1})	17
Tabla 4.- Análisis de la viabilidad de las semillas no germinadas al finalizar el ensayo de modificación del pH y salinidad del sustrato, según el test del tetrazolio	19
Tabla 5.- Influencia de distintas hormonas, giberelina (AG), citoquinina (benzyl-aminopurine) y auxina (2-4 DP) y KNO_3 sobre el porcentaje de la germinación acumulada (G, %), de la germinación máxima (A, %), y de los parámetros de germinación, tiempo para alcanzar el 50 % de la germinación (t_{50} , días) y velocidad de germinación ($k/2$, d^{-1})	22
Tabla 6.- Análisis de la viabilidad de las semillas no germinadas al finalizar el ensayo de influencia de hormonas y KNO_3 sobre la germinación, según el test del tetrazolio	23
Tabla 7.- Efecto de la edad de las semillas y de la aplicación de ácido giberélico, sobre el porcentaje de la germinación acumulada (G, %), de la germinación máxima (A, %), y de los parámetros de germinación, tiempo para alcanzar el 50 % de la germinación (t_{50} , días) y velocidad de germinación ($k/2$, d^{-1})	26
Tabla 8.- Análisis de la viabilidad de las semillas no germinadas al finalizar el ensayo de la influencia de la edad de las semillas, según el test del tetrazolio	27
Tabla 9.- Análisis de la viabilidad de las semillas de los distintos años de recolección (2010, 2011, 2012, 2013 y 2014) antes de empezar el ensayo de germinación, según el test del tetrazolio	27
Tabla 10.- Efecto de los diferentes materiales vegetales semillas (<i>Capparis spinosa</i> subsp <i>rupestris</i> y subsp <i>spinosa</i>) y de la aplicación de ácido giberélico, sobre el porcentaje de la germinación acumulada (G, %), de la germinación máxima (A, %), y de los parámetros de germinación, tiempo para alcanzar el 50 % de la germinación (t_{50} , días) y velocidad de germinación ($k/2$, d^{-1})	30
Tabla 11.- Análisis de la viabilidad de las semillas no germinadas al finalizar el ensayo comparativo de los distintos materiales vegetales, según el test del tetrazolio	31
Tabla 12.- Análisis de la viabilidad de las semillas de las subespecies <i>rupestris</i> y <i>spinosa</i> , y de semilla comercial (<i>C. spinosa</i>) antes de realizar el ensayo de germinación	31

Índice de anejos

Fotografías:

Fotografía 1. – Mapa topográfico de viabilidad de las semillas de Capparis spinosa según el test del tetrazolio: 1: Semilla viable. 2: Semilla viable con poder germinativo pobre. 3 y 4: semillas no viables.....	1
Fotografía 2. – Planta de alcaparro	2
Fotografía 3. – Bandeja de plantas de alcaparro	2
Fotografía 4. – Detalles de la planta de alcaparro	3
Fotografía 5. – Detalles de la raíz de alcaparro.....	3
Fotografía 6. – Detalles de la raíz de alcaparro 2.....	3
Fotografía 7. – Detalles de las hojas del alcaparro	4
Fotografía 8. – Detalles de las flores del alcaparro	5
Fotografía 9. – Detalles de los botones florales del alcaparro	5
Fotografía 10. – Detalles del fruto del alcaparro. A, fruto en la planta. B, fruto abierto	6
Fotografía 11. – Detalle de las semillas de alcaparro	6
Fotografía 12. – Detalles de las fases de germinación de la semilla de alcaparro	7
Fotografía 13.- A: Cubierta de semilla no germinada. B: Cubierta de semilla germinada. C: Cubierta de semilla escarificada con ácido sulfúrico	8

1 INTRODUCCIÓN

1.1 Generalidades

El alcaparro, alcaparra o tapenera es el nombre común de la especie *Capparis spinosa*, una planta arbustiva aromática y medicinal, de la cual se aprovecha principalmente sus capullos florales, las alcaparras, y sus frutos, los alcaparrones, ambos comestibles. El alcaparro tiene un origen tropical, pero crece de forma silvestre en el litoral Mediterráneo, donde se concentran sus principales zonas de cultivo. Es una planta muy rústica, típica de secano que crece de manera espontánea en lugares secos como ruinas o muros situados al sur. Crece y se desarrolla en suelos y climas desfavorables para otros cultivos. Aparte de su aprovechamiento culinario también se cultiva para uso medicinal, cosmético y ornamental.

1.2 Taxonomía

REINO	Plantae
DIVISION	Magnoliophyta
CLASE	Magnoliopsida
SUBCLASE	Dilleniidae
ORDEN	Brassicales
FAMILIA	Capparaceae
GENERO	<i>Capparis</i>
ESPECIE	<i>Capparis spinosa</i> L.

La familia de las caparidáceas es un grupo de unas 420 especies de origen tropical y subtropical, típicas de países cálidos y de diferentes usos.

1.3 Descripción botánica

El alcaparro (Anejo I. Fotografía 2, 3 y 4), es una planta dicotiledónea arbustiva perene, plurianual que llega a medir, a la edad adulta, de 50 a 80 cm de altura y de 1 a 1,5 m de largo. Se caracteriza por tener un tronco corto y una parte aérea formada por tallos tiernos y rastreros que son renovados cada año a partir de las yemas de la base leñosa. Los tallos se desarrollan en dos fases: una primera de crecimiento vegetativo durante la cual no hay iniciación floral y una segunda fase, cuando el tallo forma un cierto número de nudos y se inicia la floración.

La raíz (Anejo I. Fotografía 5 y 6) es gruesa y fuerte, poco ramificada, muy profunda (pudiendo alcanzar los 10 metros (Luna y Pérez, 1985), lo que le permite acceder a capas profundas del subsuelo para extraer agua y adaptarse a condiciones áridas de sequía. El sistema radical está separado de los tallos por una cepa, o cabeza, provista de yemas. Los tallos tiernos emergen de las yemas de la cepa cada año en los meses de abril y mayo; son rastreros y pueden llegar a medir tres metros de longitud. Las hojas (Anejo I. Fotografía 7), son alternas, de peciolo corto, redondeadas, enteras, gruesas y de color verde. En las variedades con espinas, se observan dos apéndices transformados en espinas en la base del peciolo. Las flores (Anejo I. Fotografía 8), aparece en las axilas de las hojas, son hermafroditas, tetrámeras, provistas de un cáliz de cuatro sépalos verdosos, cuatro pétalos blancos rosados, numerosos estambres alargados de color violáceo y sus anteras son

amarillas. El ovario El ovario está sostenido en una columnilla (ginóforo), que es una prolongación del eje floral. El botón floral (Anejo I. Fotografía 9), representa una de las partes aprovechadas más importantes del alcaparro, las alcaparras. En la segunda fase del desarrollo de los tallos, se inicia la floración. Las yemas florales suelen estar presentes en la parte apical del tallo. La antesis ocurre durante la noche hasta la salida del sol, a partir entonces se empiezan a marchitar las flores. La polinización ocurre por vía entomófila y anemófila, y la fecundación es principalmente cruzada. El fruto (Anejo I. Fotografía 10 A), o alcaparrón, es una baya aovada, dehiscente, de unos 2 a 4 cm de longitud, tiene un pedúnculo largo y es de color verde cuando es joven y más rojiza cuando madura. Su interior es carnoso y contiene numerosas semillas (de 15 a 400 semillas, con una media de 130 semillas por fruto). Al llegar a su madurez, el fruto se abre (Anejo I. Fotografía 10 B) permitiendo la diseminación de las semillas, que se hace en gran parte gracias a pájaros, hormigas y otros insectos.

1.4 Ciclo vegetativo

El alcaparro reanuda su actividad vegetativa a principios de primavera y florece a principios de verano, en el mes de junio. Florece y fructifica durante el verano hasta otoño (septiembre octubre). En otoño cesa su actividad vegetativa, se defolia y se caen las ramas, quedando un tronco desnudo. Entra en latencia hasta la primavera siguiente.

1.5 Adaptación ecológica

El alcaparro es una planta xerofítica que, gracias a las características de sus órganos, es capaz de adaptarse y desarrollarse en zonas de clima árido y semiárido. El alcaparro es una especie muy rústica típica de secano. Crece de forma silvestre en ruinas, muros en dirección al sur. Al ser una especie tan rústica, no tiene necesidades restrictivas en cuanto al suelo; puede crecer y desarrollarse en cualquier tipo de suelo y se adapta bien a suelos calizos o secos. En cuanto a clima, es una planta típica de secano y climas cálidos, siendo muy resistente a la sequía, pero sensible a heladas y humedad excesivas. Necesita temperaturas medias anuales superiores a los 14°C. Al ser una planta xerofítica, resiste sequías y estrés salino moderado. Tolera perfectamente los vientos marinos, lo cual demuestra una cierta tolerancia a la salinidad. Aunque tolere la sequía, tiene necesidades de pluviometrías superiores a los 200 mm, para su adecuado cultivo.

Prefiere suelos ligeros y bien drenados ya que es sensible a la asfixia radical. Se adapta bien a suelos limoso arenosos. Se adapta bien a un pH neutro-alcalino, de 6 a 9, y es muy tolerante a la caliza activa. Es una planta heliófila por lo cual requiere mucha luz para florecer de manera abundante.

1.6 Usos e importancia

El uso principal del alcaparro es culinario, de ahí el aprovechamiento de sus frutos, capullos florales e incluso tallos tiernos en encurtido, en salmueras, vinagres en conserva, etc. También se aprovecha para sus virtudes medicinales, La corteza de la raíz es un analgésico y un diurético y se usa para sanar las infecciones gastro-intestinales, Los botones florales tienen propiedades laxativas y estimulan el apetito. También pueden llegar a tener un uso cosmético y ornamental.

Tradicionalmente los principales países productores y exportadores han sido España, Marruecos, Italia, Turquía y Túnez, pero en la actualidad el cultivo de la alcaparra en España es poco importante comparada con otros cultivos, tanto en superficie cultivada como económica. Sus principales zonas

de cultivo en España han sido las islas Baleares y Almería, pero también lo han sido las provincias de Valencia y Murcia.

El alcaparro resulta interesante desde el punto de vista agronómico y ecológico. Su importancia agronómica se apoya en su capacidad de ser un cultivo intercalar y de aportar materia orgánica al suelo (Reche, 1967).

Debido a su ciclo vegetativo, el alcaparro es un cultivo intercalar, con una compatibilidad con cereales demostrada (Reche, 1967), mejora el rendimiento del cereal. Además de su capacidad a crecer y desarrollarse en lugares áridos, lo cual permite cultivarlo en zonas desfavorables para otros cultivos, el cultivo del alcaparro también tiene un papel ecológico, que se está investigando en países de África del norte como Marruecos, Túnez y Argelia. Entre sus principales virtudes ecológicas podemos apuntar que, gracias a su extenso volumen foliar rastrero, reduce la evaporación del agua del suelo y permite conservar la humedad aportada por la lluvia en suelos pobres y secos. Su potente sistema radical y su superficie foliar también protegen de la erosión del suelo por acción del viento (Reche, 1967).

1.7 Propagación

La propagación del alcaparro puede realizarse de tres formas distintas: sexual (semillas), asexual (estaquillado) y cultivo in vitro, resultando problemática en los dos primeros casos.

1.7.1 Propagación asexual

El alcaparro es una especie cuyas estaquillas enraízan con mucha dificultad, así que, aunque se podrían usar teóricamente estacas herbáceas, semileñosas y leñosas, solo estas últimas dan resultados aceptables. Además, existe una gran variabilidad en cuanto al enraizamiento entre especies, cultivares, clones e incluso entre tallos de una misma planta.

El cultivo in vitro del alcaparro se realiza en 4 etapas: iniciación, multiplicación, enraizamiento y aclimatización. A partir de una yema terminal, se pueden obtener hasta 25 plántulas en unas 12 semanas. Se caracteriza por ser el método de multiplicación más rápido y prolífico. En un año se puede obtener a partir de una planta madre un millón de plantas. Además, facilita la selección genética y permite obtener plantas libres de virus. Se pueden producir las plantas en cualquier época del año. Por otra parte, es un método mucho más exigente a nivel técnico y en cuanto a costes que todos los demás.

1.7.2 Propagación sexual

La siembra de semillas es el método más utilizado en los países productores, debido a su rentabilidad y a su facilidad de realización. Aunque la semilla presenta unas limitaciones en cuanto a su uso, la semilla del alcaparro tiene una tasa de germinación muy baja, del orden del 5-10% (Luna et Pérez., 1985).

Se recolectan los frutos dehiscentes entre los meses de junio a septiembre y se les deja secar durante unos días. Las semillas recolectadas pueden o bien ser sembradas directamente, en ese caso no presentan un nivel de latencia tan importante y tienden a germinar más fácilmente y con mayor uniformidad, o bien se pueden almacenar. En este caso, las semillas conservan un poder germinativo

constante durante dos años, pero va decayendo progresivamente más allá de este tiempo. La siembra directa de semillas almacenadas se ha abandonado debido al bajo porcentaje de germinación que presentan, del orden del 5%. Hoy en día se realiza una siembra indirecta: se someten las semillas a procesos de escarificación y estratificación antes de sembrarlas. Se suele realizar en febrero-marzo con una densidad de $2 \text{ g} \cdot \text{m}^{-2}$ (200 semillas), a una profundidad de 2 cm. Las ventajas de la siembra frente a la propagación asexual son sobre todo su bajo coste y su baja exigencia de nivel técnico. Además, se pueden obtener muchas semillas de cada planta (unas 130 semillas por fruto de media y 45.000 semillas de media por planta) y tiene una mayor facilidad al transporte y almacenamiento.

Como principal inconveniente, se puede resaltar la importante heterogeneidad de las plantas de alcaparro, al ser de polinización cruzada. Esta variabilidad se puede manifestar con el color de las hojas, pero también con la época de floración, la forma y el color de las flores y sobre todo con la forma y la calidad de las alcaparras y los alcaparrones. Además, la tasa de germinación de las semillas varía según variedades, cultivares e incluso dentro de una misma planta.

1.7.2.1 La semilla

La semilla del alcaparro (Anejo I. Fotografía 11), tiene una cubierta muy dura y poco permeable al agua, además de un embrión envuelto en el tejido de reserva, la cual puede ser la causa de la baja e irregular tasa de germinación (Reche, 1967). También podría resultar de la formación de una capa de mucílago alrededor de la semilla cuando ésta en contacto con un sustrato saturado de agua, capa que impide la imbibición (Orphanos, 1973).

1.7.2.2 La germinación

La germinación (Anejo I. Fotografía 12), es el proceso de reactivación de la maquinaria metabólica de la semilla y de la emergencia de la radícula y de la plúmula, conducentes a la producción de una planta (Hartman et al, 2011)

Para que la germinación se lleve a cabo son indispensables tres condiciones:

- La semilla ha de ser viable, el embrión vivo y capaz de germinar
- No ha de estar en estado de latencia
- Las condiciones ambientales deben ser adecuadas, presencia de agua, oxígeno, un rango de temperaturas adecuado y a veces luz para permitir los distintos procesos metabólicos de la semilla y el adecuado desarrollo de la plántula.

La germinación de la semilla se caracteriza en dos fases: una primera, la iniciación de la germinación, desde la imbibición hasta la emergencia de la radícula y una segunda fase, la movilización de reservas y el crecimiento de la plántula.

Imbibición o absorción de agua: el proceso se produce por diferencia de potencial hídrico. La semilla seca absorbe agua gradualmente según el tipo de tejido, sea o no viable o latente. La imbibición se da a la vez que la respiración, siguiendo el mismo patrón. Los procesos de imbibición y de respiración presentan tres fases, las cuales corresponden a la división celular y la aparición de la radícula. Empieza por una primera fase de absorción rápida de agua, exponencial durante los 30 primeros

minutos, y más lenta durante las siguientes horas. La semilla absorbe el agua gradualmente y de manera no uniforme según el contenido de los diferentes tejidos, siendo las proteínas los componentes de la semilla más importante en la imbibición. Sigue una segunda fase, donde la imbibición se estabiliza, y la actividad metabólica se activa. La respiración es entonces anaerobia. Esta fase es crítica para la germinación, ya que gran parte de la actividad metabólica presente está destinada a reparar las membranas dañadas durante la desecación. Los procesos metabólicos más importantes son la maduración de las mitocondrias, la síntesis de proteínas y de enzimas, los metabolismos de almacenamiento de reservas, y la síntesis de ARNm, ARNr, ARNp, ARNt y ADN. En la tercera fase, la imbibición y la respiración vuelven a ser rápidas e importantes, debido al crecimiento de la radícula, debido a la elongación celular y su posterior emergencia que rompe las cubiertas dejando paso libre al oxígeno y al agua.

1.7.2.3 Las hormonas giberelinas, citoquininas, compuestos nitrogenados y ABA en la germinación de las semillas.

El ácido abscísico es el principal inhibidor de la germinación: la concentración de ácido abscísico (ABA) aumenta durante las últimas fases del desarrollo de la semilla e induce la latencia primaria. La latencia de la semilla no está directamente condicionada por la presencia de ABA, lo es por el efecto inhibitorio del ABA sobre las giberelinas. El ABA inhibe enzimas de biosíntesis de giberelinas y promueve la acción de enzimas de biodegradación de las giberelinas. La acción del ABA sobre las giberelinas es lo que condiciona la latencia y la posibilidad de germinar de la semilla. (Hartmann et al, 2011).

Las giberelinas juegan un papel importante en el control y la promoción de la germinación; actúan induciendo la acción y la síntesis de enzimas que debilitan las cubiertas de la semilla en la zona de la radícula, induciendo la movilización de reservas y estimulando la expansión celular. Las giberelinas aparecen en concentración importante durante el desarrollo de la semilla, pero van decayendo hasta niveles menores en semillas maduras y aletargadas

Las hormonas citoquinas no parecen tener un efecto directo sobre la germinación de la semilla, sin embargo, las aplicaciones exógenas de citoquininas parecen compensar positivamente el balance del ABA y conseguir romper la latencia de las semillas. Parece que la interacción antagonista, entre las citoquininas y el ABA, puede promover la síntesis de etileno, favorecido por la acción de las citoquininas, lo cual reduce la sensibilidad de la semilla al ABA (Hartmann et al, 2011). También se ha sugerido que las citoquininas juegan un papel permisivo en la germinación, permitiendo la actividad de las giberelinas (Hartmann et al, 2011). La actividad de las citoquinas es importante en los primeros estadios del desarrollo del fruto y de la semilla, pero disminuye cuando la semilla madura.

Los compuestos nitrogenados tienen una acción conocida en la estimulación de la germinación de las semillas, pero su papel aún no está claro. El uso de nitrato potásico ha sido un tratamiento importante en los ensayos de germinación de semillas. Un papel sugerido de los compuestos nitrogenados es su interacción con enzimas en la ruta de la pentosa fosfato, la cual implica la producción de NADPH y oxígeno, que son requeridos para el catabolismo del ABA (Hartmann et al, 2011).

1.7.2.4 La nacencia

La nacencia de la semilla de alcaparro es epigea, propia de las especies originarias de climas cálidos, en primavera y verano, con temperaturas adecuadas para realizar la fotosíntesis. La nacencia epigea se caracteriza por la elongación del hipocótilo que provoca la emergencia de los cotiledones por encima de la superficie del suelo. Una vez emergidos los cotiledones, se transforman de tejidos de reserva a órganos fotosintéticamente activos. La actividad fotosintética de los cotiledones, implica un crecimiento rápido de la plántula.

1.7.2.5 La latencia

Una semilla es latente cuando no consigue germinar incluso bajo condiciones ambientales idóneas a la germinación. La latencia es un método de control de la germinación para evitar una nacencia en condiciones adversas.

La latencia primaria es una condición común en algunas semillas cuando se separan de la planta madre; previene de la germinación inmediata y controla el cuándo, dónde y en qué condiciones germinará la semilla. La latencia primaria puede ser exógena, provocada por factores exteriores al embrión; puede ser física (impermeabilidad al agua y gases, resistencia física de las cubiertas) o química, por la presencia de inhibidores de la germinación en la cubierta. También puede ser endógena, condicionada por factores del propio embrión, generalmente por inmadurez morfológica o inhibición fisiológica.

La latencia secundaria es un mecanismo que puede inducirse bajo condiciones ambientales desfavorables y posponer la germinación. Puede ocurrir después de romperse la latencia primaria y prolongar la latencia.

En el caso de la semilla de la alcaparra, la latencia podría ser provocada por factores exógenos, la dureza de las cubiertas, y por factores endógenos, inhibición fisiológica.

Se puede controlar la latencia de las semillas por distintos métodos, como el control hormonal, la escarificación, la estratificación, dependiendo del origen de la latencia.

En el caso de la semilla de alcaparra, la estratificación ha sido un método muy utilizado en España, consistente en simular la vernalización, colocando las semillas bajo capas de arena húmeda durante 25 a 50 días (Luna y Pérez, 1985). El método de estratificación permite obtener un porcentaje de germinación del orden de 30-40% (Barbera, 1991).

Varios métodos de escarificación se han usado en el control de la latencia de las semillas de alcaparro. La escarificación química con ácido sulfúrico puro durante 15 a 30 minutos permite obtener un porcentaje de germinación del 40% (Orphanos, 1973). También se observaron buenos resultados con la inmersión de las semillas en ácido sulfúrico diluido al 0,5 ‰ durante diez minutos (Reche, 1967). La inmersión en permanganato potásico durante una hora, también dio buenos resultados (Reche, 1967).

El equipo de investigación, en el seno del cual se ha llevado a cabo este trabajo, ha pensado y probado otros métodos de escarificación, como la escarificación térmica (inmersión en agua caliente), física (estimulación por medio de láser, y ultrasonidos), así como el remojo.

2 Objetivos

El objetivo general de este Trabajo Final de Grado consiste en avanzar en el conocimiento de factores que contribuyan a mejorar la germinación de las semillas de *Capparis spinosa* L., que se concreta en los siguientes apartados:

- Influencia de varios métodos de escarificación y reblandecimiento de las semillas.
- Influencia del pH y de la salinidad del sustrato en la germinación de las semillas.
- Influencia de la aplicación de distintas hormonas (una giberelina, una citoquinina y una auxina) y del nitrato potásico al sustrato, en la germinación de las semillas.
- Influencia de la edad de las semillas en su capacidad de germinación.
- Estudio comparativo de la germinación de semillas de distinta procedencia.

3 Material y métodos

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

El material vegetal utilizado procede de las siete plantas de *Capparis spinosa*, procedente de estaquillas, cultivadas en la parcela 214, del polígono 26, del término municipal de Valencia, situada junto al Campus de Vera. Los frutos fueron recolectados entre principios de septiembre y finales de octubre. Las semillas se extrajeron de los frutos, se eliminaron los restos de pulpa y se lavaron. Se separaron las semillas inmaduras de las maduras por decantación, ya que las semillas inmaduras flotan. Para prevenir ataques parasitarios y poder almacenar las semillas, se desinfectaron con una solución de hipoclorito sódico al 25 % durante 2 minutos, seguido de lavados en agua destilada. Se dejaron secar las semillas sobre papel de filtro durante 24 horas antes de almacenarlas en botes cerrados herméticamente.

El trabajo consta de 6 experimentos que se realizaron de marzo de 2015 hasta agosto de 2015. Para la germinación de las semillas, se usó el método BP (Between Paper) [reglas ISTA (2007)], se colocaron las 50 semillas entre dos papeles de filtro siempre húmedos en una placa Petri de 9 cm de diámetro. Salvo en que se especifique el contrario, todos los experimentos se duplicaron, humedeciendo el papel de filtro con agua destilada o con una solución de ácido giberélico de 500 ppm (Semefil-L. Nufarm. Ácido giberélico 1,6% p/v). Las placas se colocaron durante el periodo de germinación en el interior de una cámara de germinación Climatronic con control de temperatura, humedad y fotoperiodo. Se fijó un fotoperiodo de 12 horas, con oscuridad a partir de las 19 hasta las 7 horas. La temperatura diurna se fijó en 30°C y la temperatura nocturna de 20°C. La humedad relativa fue de 85% durante todo el periodo. La iluminación proporcionada por tubos fluorescente blancos y fríos fue de 15.000 luxes.

Todos los experimentos se realizaron de la misma manera, se utilizaron en cada caso 4 repeticiones de 50 semillas. Los ensayos de germinación se consideraron aceptables cuando la diferencia entre los porcentajes máximos y mínimos entre las 4 repeticiones no sobrepasaban la tolerancia establecida por las Reglas Internacionales para ensayos de semilla (ISTA, 2007).

Salvo que se especifique lo contrario, las semillas puestas a germinar en los siguientes experimentos fueron de *Capparis spinosa* subsp. *rupestris* con procedencia de Lliria, recolectadas en la primera semana de octubre de 2013 en la parcela del Campus de Vera.

La germinación de cada repetición se determinó anotando el número de semillas germinadas cada 3 días, considerando germinada una semilla cuando su radícula era visible.

3.1 Mejora de la germinación mediante escarificación.

En el siguiente experimento se probó varios métodos de escarificación para intentar debilitar la cubierta de la semilla y romper la latencia extraembrionaria.

Se trató de ablandar la cubierta mediante remojo en agua destilada durante 7 días. Se contaron 800 semillas previamente almacenadas herméticamente, las cuales se pusieron en remojo en agua

destilada a 40°C. Durante 7 días, se dejaron las semillas en una nevera calentada a 40°C con una bombilla de 100 Vatios encendida. Al cabo de los 7 días, se colocaron las semillas en las placas Petri de la manera anteriormente expuesta.

Se realizó otra escarificación térmica, se contaron 800 semillas, se calentó en un microondas dos litros de agua destilada hasta la ebullición, cuando el agua alcanzó los 100 grados Celsius, se introdujeron las semillas que se encontraban a temperatura ambiente dentro del agua caliente y se dejaron una hora en remojo hasta que el agua se enfrió. Luego se colocaron las semillas en las placas Petri.

La escarificación mecánica se realizó rompiendo la cubierta de la semilla ejerciendo una presión con el dedo sobre la semilla hasta quebrantar la cubierta. Luego se colocaron las semillas en las placas Petri.

Se realizó una escarificación química con ácido sulfúrico (AppliChem Panreac. Ácido Sulfúrico 98 % PA-ISO), Se contaron 800 semillas, y se pusieron un vaso de precipitado de cristal. En una campana extractora, se llenó el vaso con ácido sulfúrico a 98%. Se dejaron las semillas en remojo en el ácido durante 30 minutos. Una vez el tiempo estipulado pasado, se lavaron las semillas abundantemente, y se colocaron en las placas Petri.

Se realizó un ensayo de alternancia de humedad-Seco del sustrato, se colocaron las semillas en placas Petri, y se alternó la humedad del sustrato cada cinco días. Durante cinco días se saturaba el papel de filtro con agua destilada, o con la solución de ácido giberélico, y al cabo de los cinco días se secaban las placas y reemplazaban los papeles de filtro húmedos por unos secos durante otros cinco días. Cada cinco días se repetía el mismo procedimiento.

El experimento se comenzó el 4 de abril y se finalizó el 15 de agosto.

3.2 Germinación con distintos tratamientos para modificar el pH y la salinidad del sustrato

Se ensayó el poder germinativo de las semillas en distintos pH (ácido y básico) y con un cierto nivel de salinidad del sustrato.

Se ensayó el pH ácido con dos soluciones de ácidos distintos, la primera solución se obtuvo con ácido cítrico procedente de zumo de limón maduro. Se exprimieron 10 limones, y se mezclaron los zumos. El zumo total tenía un pH de 2,34, el cual se diluyó con agua destilada, hasta una concentración de $1 \cdot 10^{-8}$ L de ácido/L de agua destilada, el pH de la solución era de 4,05.

La segunda solución se obtuvo con ácido fórmico (AppliChem Panreac. Ácido Fórmico 98%), el cual se diluyó a una concentración de $1 \cdot 10^{-14}$ L de ácido/L de agua destilada; el pH de la solución fue de 4,44.

El pH básico se obtuvo con una solución de cal (GUINAMA. Calcio carbonato), se diluyó 1,05 g de cal en 1 L de agua destilada, y se obtuvo una solución con un pH de 8,52.

Se ensayó un nivel de salinidad de 4500 dS/m, se diluyó 28,80 gramos Cloruro de sodio en 1L de agua destilada.

Se realizaron dos litros de cada solución en dos botellas de plástico, en una de cada solución se añadió ácido giberélico hasta obtener 500 ppm de cada dilución para poder duplicar el experimento sin y con AG.

Como control se usó agua destilada con pH de 5,37. El experimento se comenzó el 4 de abril y se finalizó el 15 de agosto.

3.3 Germinación bajo la influencia de distintas hormonas y de nitrato potásico

Se ensayó la influencia de distintas hormonas sobre la germinación de las semillas de *Capparis spinosa*. Se ensayaron tres hormonas, una giberelina, una citoquinina y una auxina, además de nitrato potásico, y se añadió un control con agua destilada.

Se humedecieron los papeles de filtro con una solución de cada hormona y de nitrato potásico.

Para el efecto de la giberelina, se realizó una solución de ácido giberélico de 500 ppm añadiendo 31,25 mL de producto comercial por litro de agua, (Nufarm. Semefil-L. Ácido giberélico 1,6% p/v).

Para el efecto de la citoquinina, se realizó una solución de 6-benzil-aminopurine, a una concentración de 0,5 g/L, (Sigma Chemical Company. N⁶-Benzyladenine).

Para el efecto de la auxina, se realizó una solución de 2,4-DP de 500 ppm (Diclorprop-P. Nufarm. Éster 2-eilhexil. 2,5% p/v).

Para el efecto del nitrato potásico, se realizó una solución al 2%, se diluyeron 2 gramos de nitrato potásico en 1 L de agua destilada.

El experimento se comenzó el 4 de abril y se terminó el 20 de agosto.

3.4 Evolución del poder germinativo con la edad de las semillas

Se pusieron a germinar semillas de *Capparis spinosa* subsp. *rupestris* procedentes de la parcela del Campus de Vera, recolectadas en los años, 2010, 2011, 2012, 2013 y 2014.

Las semillas de 2010 se recolectaron en la segunda quincena de septiembre de 2010.

Las semillas de 2011 se recolectaron el 19 de septiembre de 2011.

Las semillas de 2012 se recolectaron en la segunda semana de septiembre de 2012.

Las semillas de 2013 se recolectaron en la segunda semana de octubre de 2013.

Las semillas de 2014 se recolectaron en la cuarta semana de octubre de 2014.

El experimento se comenzó el 3 de marzo y se terminó el 31 de julio.

3.5 Poder germinativo de las semillas procedentes de diferente material vegetal

Se trató de comparar la germinación de semillas de tres materiales vegetales diferentes, dos de producción propia, producidas en la parcela de experimentación, identificados como *Capparis spinosa* subsp. *rupestris* (procedente de Lliria) y *Capparis spinosa* subsp. *spinosa* (procedente de

Mallorca), utilizando la Flora Ibérica (Flora Ibérica vol. III. 2ª edición. 28-XII-2005. Capparis. Pg. 519). La otra semilla corresponde a semilla adquirida en el comercio (ROCALBA. Colección Flornova), bajo la denominación de *Capparis spinosa*, en cuyo envase figuraba la fecha de recolección (febrero de 2012) y de caducidad (febrero de 2016).

Las semillas de *Capparis spinosa* subsp. *rupestris*, se recolectaron en la segunda semana de octubre de 2013. Y las semillas de *Capparis spinosa* subsp. *spinosa*, se recolectaron en la tercera semana de octubre de 2013. El experimento se comenzó el 3 de marzo y se terminó el 15 de agosto.

3.6 Test de viabilidad con tetrazolio

Al finalizar cada experimento, se realizó un test de viabilidad de las semillas no germinadas de cada repetición. Para realizarlo se siguió el manual de ensayos al tetrazolio del Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación (1986). Se usó el producto tetrazolium (Sigma. Tetrazolium Red. 2,3,5-Triphenyltetrazolium chloride), al 1%. En 100 mL de agua destilada se diluyó 1 g de tetrazolio. Para realizar el experimento, se usó un tubo de ensayo para 10 semillas de cada repetición. Se realizó un pequeño corte en la cubierta de la semilla, en la parte opuesta al micrópilo, para que penetrara adecuadamente el producto. Se recubrieron las semillas con la dilución del tetrazolio y se dejó en oscuridad durante 24 horas. Entonces se realizó un corte transversal de la semilla y se observó la coloración, su intensidad y repartición. Se determinó la viabilidad según el mapa de viabilidad de semillas de *Capparis spinosa* (Anejo I. Fotografía 1).

3.7 Modelo matemático

En estudios previos (Pascual et al., 2003) han determinado que el modelo logístico permitía un análisis adecuado de las curvas de germinación de semillas de *Capparis spinosa*. Los siguientes ensayos se analizaron en su totalidad con esa función con el paquete estadístico STATGRAPHIC 5.1.

La función logística es la siguiente:
$$G = \frac{A}{[1+e^{\beta-k*t}]}$$

Dónde: G es la germinación acumulada (%)

A es la germinación máxima (%)

t es el periodo de germinación (días)

B es un parámetro referente a la posición de la curva en relación al eje de tiempo de germinación

Y k es un parámetro referente a la velocidad.

Para los siguientes experimentos, se calculó y analizó, los parámetros con significado biológico de la función logística, la germinación máxima (A), el número de días que tardó en germinar el 50% de las semillas ($t_{50} = \beta / k$) y la velocidad de germinación ($k/2$).

3.8 Análisis estadístico

Para cada uno de los ensayos, se han analizado los resultados mediante un análisis factorial de la varianza usando el paquete estadístico STATGRAPHIC 5.1. La separación de medias se ha realizado con el test LSD. Las diferencias se han considerado para $p \leq 0,05$.

4 Resultados y discusiones

El ajuste de los datos obtenidos en este ensayo de germinación al modelo logístico, ha resultado estadísticamente significativo ($P \leq 0,05$) para todas las curvas de germinación que cumplieran la hipótesis de normalidad (124), con coeficientes de determinación (R^2) comprendidos entre 0,931 y 0,999. Estos resultados confirman que el uso de la función logística es adecuado para el análisis de la germinación de las semillas de alcaparra tal y como se muestra en anteriores estudios sobre la alcaparra (Pascual *et al*, 2006; Pascual *et al*, 2009). Al adecuarse la función logística a los ensayos de germinación, permite el uso de las variables A, β y k, aunque también se presentará G para mostrar su similitud con A.

4.1 Germinación con distintos métodos de escarificación

El tratamiento de escarificación térmica (inmersión en agua hirviendo) mostro un porcentaje de germinación nulo. Los tratamientos de escarificación química (ácido sulfúrico) y mecánica (rotura de la cubierta) mostraron un porcentaje de germinación casi nulo. Por lo que no se han incluido en el ANOVA por no cumplirse la hipótesis de normalidad.

La figura 1 representa el modelo logístico ajustado de la germinación acumulada correspondiente a los valores medios de los diferentes tratamientos de escarificación y de la aplicación de AG. Se observa que la aplicación de AG ha aumentado el porcentaje de germinación y ha acelerado la germinación de las semillas.

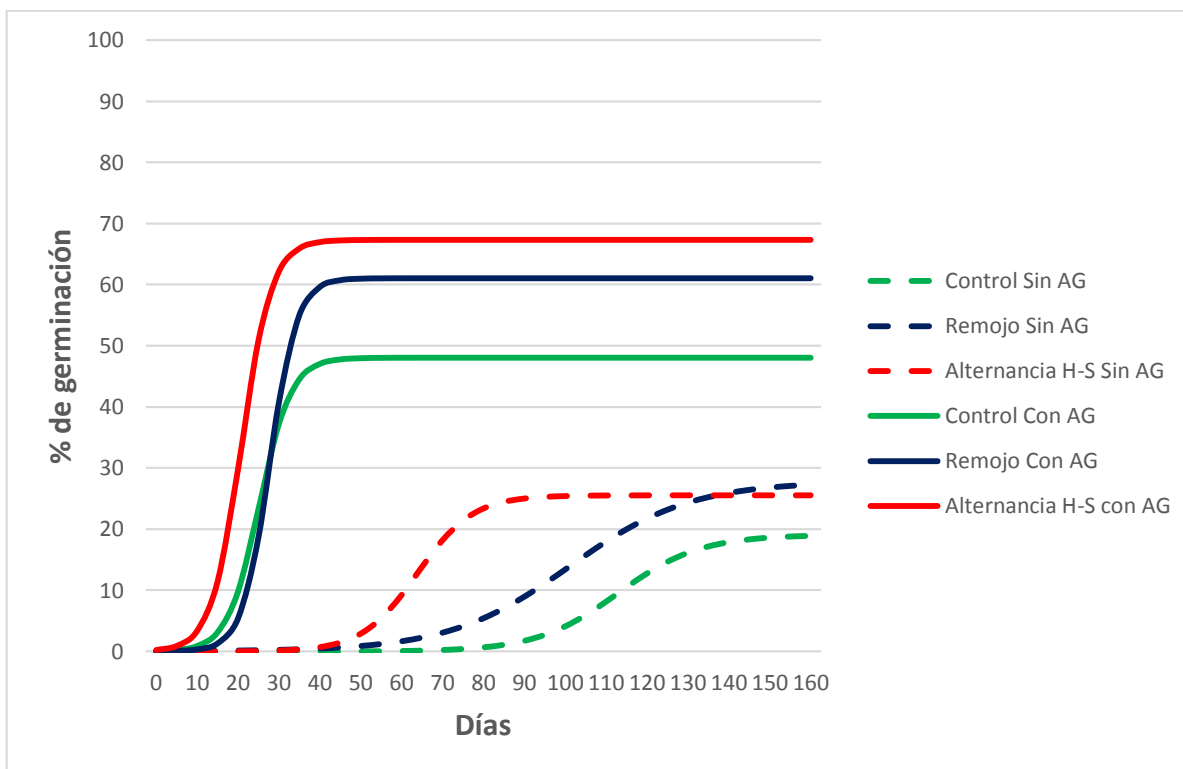


Figura 1 – Modelo logístico ajustado de germinación acumulada. Valores medios para los distintos tratamientos de escarificación y aplicación de AG.

En la tabla 1 se expone el análisis estadístico del porcentaje de germinación acumulada (G, %), y de los valores medios de los parámetros A (%), t_{50} (días) y $k/2$ (d^{-1})

Tabla 1. – Influencia de distintos métodos de escarificación (Remojo y Alternancia H-S), y de la aplicación de AG, sobre el porcentaje de la germinación acumulada (G, %), de la germinación máxima (A, %), y de los parámetros de germinación, tiempo para alcanzar el 50 % de la germinación (t_{50} , días) y velocidad de germinación ($k/2$, d^{-1})

		G	A	Gt_{50} (β/k)	$k/2$
Escarificación (E)	Control (C)	32,75 b	35,52 b	69,07 a	0,0899 -
	Remojo (R)	44,0 a	44,39 a	64,22 b	0,0927 -
	Alternancia H-S	46,25 a	45,90 a	42,75 c	0,1048 -
AG	Sin AG	23,17 b	23,76 b	92,74 a	0,0525 b
	Con AG	58,83 a	58,78 a	24,62 b	0,1391 a
E x AG	Control Sin AG	17,5	19,04	112,60	0,0498
	Control Con AG	48,0	48,00	25,54	0,1299
	Remojo Sin AG	27,0	27,74	100,89	0,0337
	Remojo Con AG	61,0	61,04	25,56	0,1517
	Alternancia H-S Sin AG	25,0	24,50	64,75	0,0738
	Alternancia H-S Con AG	67,5	67,31	20,76	0,1358
Análisis de la varianza		% Suma de cuadrado			
Parámetros (g.l.)					
Escarificación (2)		9,6 **	8,7 **	9,5 **	1,7 NS
AG (1)		87,3 **	87,4 **	84,0 **	77,0 **
E x AG (2)		1,7 **	2,4 **	5,8 **	5,6 NS
Residual (18)		1,7	1,6	0,7	15,7
LSD ($p \leq 0,05$)		3,39	3,46	4,00	-

Letras diferentes 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 ($P \leq 0,01$)

En la tabla 2 se expone el análisis estadístico del porcentaje de viabilidad de las semillas no germinadas al finalizar el ensayo, según el test del tetrazolio. En la tabla 8 se expone el análisis estadístico del porcentaje de viabilidad de las semillas no germinadas al finalizar el ensayo. El ácido giberélico mostró una vez más una viabilidad nula al acabar el ensayo, es decir que todas las semillas que conservaban la capacidad germinativa, habían germinado.

Tabla 2. – Análisis de la viabilidad de las semillas no germinadas al finalizar el ensayo según el test del tetrazolio.

		Viabilidad (%)
Escarificación (E)	Control (C)	31,25 a
	Remojo (R)	28,75 b
	Alternancia H-S (H-S)	0,00 c
AG	Sin AG	40,00 a
	Con AG	0,00 b
E x AG	Control Sin AG	62,5
	Control Con AG	0,0
	Remojo Sin AG	57,5
	Remojo Con AG	0,0
	H-S Sin AG	0,0
	H-S Con AG	0,0
Análisis de la varianza		% Suma de cuadrado
Parámetros (g.l.)		
Escarificación (2)		39,8 **
AG (1)		19,8 **
E x AG (2)		39,8 **
Residual (18)		0,6
LSD ($p \leq 0,05$)		3,89

Letras diferentes en una columna indican diferencias significativas con ($P \leq 0,05$) según el test LSD.

NS. No significativo

* Nivel de significación ($P \leq 0,05$)

** Nivel de significación ($P \leq 0,01$)

4.1.1. Germinación acumulada (G, %) y máxima (A, %):

El efecto de los tratamientos de escarificación y la adición de AG tuvieron una influencia significativa ($P \leq 0,01$) sobre las variables G y A, resultando significativa la interacción entre ambos, de manera que cada uno de ellos explica el 8,7 %, 87,3 % y 2,4 % respectivamente de la variabilidad total. Los valores de G y A de los dos tratamientos de escarificación (Remojo y alternancia H-S) resultaron mayores que los del control ($P \leq 0,05$), pero no han diferido entre sí ($P \leq 0,05$). Los mayores valores de germinación máxima (A) se observaron con el remojo y la alternancia H-S [sin diferir ($P \leq 0,05$) entre ellos], tanto con AG (61,04 % y 67,31 % respectivamente) como sin AG (27,0 % y 25,0 respectivamente). El control mostró los valores de A más bajos (48,0 % con AG y 17,5 % sin AG).

El efecto del AG, ha resultado significativo ($P \leq 0,01$) con valores de A de 58.8 % con AG, y valores de 23,8% sin AG.

Al analizar la interacción se observa que mientras las diferencias en el porcentaje de germinación de las semillas de los tratamientos de remojo y alternancia H-S tratadas con AG han resultado significativas ($P \leq 0,05$), no lo han sido estos mismos tratamientos sin AG. La aplicación de AG

parece haber afectado más la germinación de las semillas tratadas con alternancia de H-S que al remojo.

En el ensayo del tetrazolio de las semillas que no habían germinado a la finalización del ensayo (160 días) ninguna semillas escarificada química, térmica o mecánicamente era viable, por lo que estos datos no aparecen en la Tabla 2, en la que se observa que únicamente las semillas control y las sometidas a remojo, sin aplicación de AG, presentaban viabilidad (62,5 y 57,5%, respectivamente), es decir que ya habían germinado todas las semillas viables que habían sido tratadas con AG, y que algunos de los tratamientos de escarificación habían dañado a todas las semillas (escarificación térmica) o a casi todas (escarificación química y térmica).

4.1.2. Tiempo para alcanzar el 50 % de la germinación, t_{50} (β/k , días)

El efecto del tratamiento de escarificación y la adición de AG tuvieron una influencia significativa ($P \leq 0,01$) sobre la variable t_{50} , resultando significativa la interacción entre ambos, de manera que cada uno de ellos explica el 9,5 %, 84,0 % y 5,8 % respectivamente de la variabilidad total.

Se observan diferencias significativas ($P \leq 0,05$) entre el t_{50} del control, el del remojo y el de la alternancia H-S, presentando el tratamiento de alternancia H-S un valor de t_{50} (43 días) muy inferior ($P \leq 0,05$) al remojo (64 días), que a su vez es inferior ($P \leq 0,05$) al control (69 días). El uso de AG adelantó la t_{50} en todos los casos, habiendo una diferencia significativa ($P \leq 0,01$) entre el uso o no de AG, con una diferencia media de 24,62 días, con AG, frente 92,74 días, sin AG. Los valores menores de t_{50} fueron alternancia H-S (20,8 días con AG y 64,8 días sin AG), los valores mayores fueron del control (25,5 días con AG y 112,6 días sin AG). El remojo se adelantó de manera significativa al control.

Al analizar la interacción se observa que mientras las diferencias en el t_{50} de las semillas del control y del tratamiento de remojo tratadas con AG han resultado significativas, no lo han sido estos mismos tratamientos sin AG. La aplicación de AG parece haber afectado más a la t_{50} del control que la del remojo.

4.1.3. Velocidad de germinación ($k/2$, día⁻¹):

Únicamente el uso de AG ha resultado significativo ($P \leq 0,01$) en cuanto a $k/2$ (representando el 77% de la variabilidad total), con valores medios de $k/2$, de 0,1391 d⁻¹ con AG, y 0,0525 d⁻¹ sin AG.

No se observan diferencias significativas entre los distintos tratamientos de escarificación para el parámetro $k/2$.

En cuanto a las semillas escarificadas térmicamente, no germinó ninguna semilla, mientras que, de las escarificadas químicamente, únicamente germinaron unas pocas semillas (de las humectadas con agua; ninguna con AG) a los 20 días del inicio del ensayo de germinación, pero ya no germinaron más semillas. En el caso de la escarificación mecánica, a los pocos días (antes de 7 días) habían germinado algunas semillas, tanto con AG como control, en un número reducido, que resultó insuficiente para obtener las curvas de germinación, y ya no germinaron más. El test de viabilidad, realizado con las semillas no germinadas al finalizar el ensayo de germinación (tabla 2), constató que ninguna semilla era viable.

Estos resultados resultan sorprendentes, puesto que en ensayos anteriores con la escarificación química (ácido sulfúrico concentrado durante 30 min) se habían conseguido porcentajes de germinación superiores al 67% (valor medio con y sin AG; Pascual et al., 2004). Probablemente el mayor tiempo del tratamiento en este estudio afectó negativamente al embrión de las semillas. Es posible que la escarificación térmica fue demasiado violenta para el embrión, una hora en 100 °C, mientras que en experimentos anteriores (Pascual et al., 2004) y con temperaturas de 50°C durante 30 min se obtuvieron porcentajes de germinación superiores al 70% (valor medio con y sin AG). A simple vista, la escarificación mecánica parecía que no había dañado al endospermo y al embrión de la semilla, ya que se realizó con sumo cuidado, ejerciendo la presión mínima necesaria para romper la cubierta y no dañar el embrión, pero a la vista del resultado del análisis del tetrazolio (tabla 2) sí que se dañó al embrión

En el tratamiento de remojo de las semillas en agua durante una semana se observaron valores de germinación significativamente superiores al control, tanto con AG (67.3%) como sin AG (27.7%). También se observó un t_{50} más adelantado al control. Estos resultados son ligeramente inferiores a los obtenidos en un estudio anterior (Pascual et al., 2004), en el que se obtuvieron valores medios del 74% con remojo de 24 h, cabe destacar que no se usaron semillas del año, sino semillas recolectadas en 2013, con una edad de dos años cuando se realizó el ensayo.

El ensayo de alternancia de humedad resultó positivo en cuanto a su germinación máxima y su t_{50} , adelantando la germinación algunos días el tratamiento conjunto con AG respecto al control. Fue realmente interesante sin AG, ya que adelantó muchísimo respecto al control, pero como se observa en la figura 1, pronto dejó de aumentar el número de semillas germinadas, y al acabar el ensayo las semillas no germinadas no eran viables (Tabla 2), y la germinadas presentaban una muy poco vigor. Dado que la alternancia no se dejó de realizar hasta el final del ensayo de germinación, hace pensar que en un número excesivo de cambios de humedad en el sustrato llegó a dañar el embrión.

Como se ha visto, estos resultados, en general, son inferiores a los obtenidos en estudios anteriores (Pascual et al., 2004), y concretamente los tratamientos de escarificación han resultado totalmente negativos, por lo que sería aconsejable repetir todo el experimento. No obstante, los resultados obtenidos con el remojo y la alternancia H-S, conjuntamente con la aplicación de AG 61 - 67%), son comparables a los citados en la bibliografía; En efecto son superiores a los obtenidos por algunos de ellos [38% Macchia and Casano (1993); 48% Yildirim (1998); 53% Tansi (1999); >50% Rinaldelli (2000)], similares a los obtenidos por Sozzi y Chiesa (1995; 68%), e inferiores a los obtenidos por Orphanos (1983; 80%).

4.2 Germinación con distintos tratamientos para modificar el pH y la salinidad del sustrato

La figura 2 representa el modelo logístico ajustado de la germinación acumulada correspondiente a los valores medios de diferentes pH y salinidad del sustrato y aplicación de AG. Se observa que, en todos los casos, la aplicación de AG ha aumentado el porcentaje de germinación y ha acelerado la germinación de las semillas.

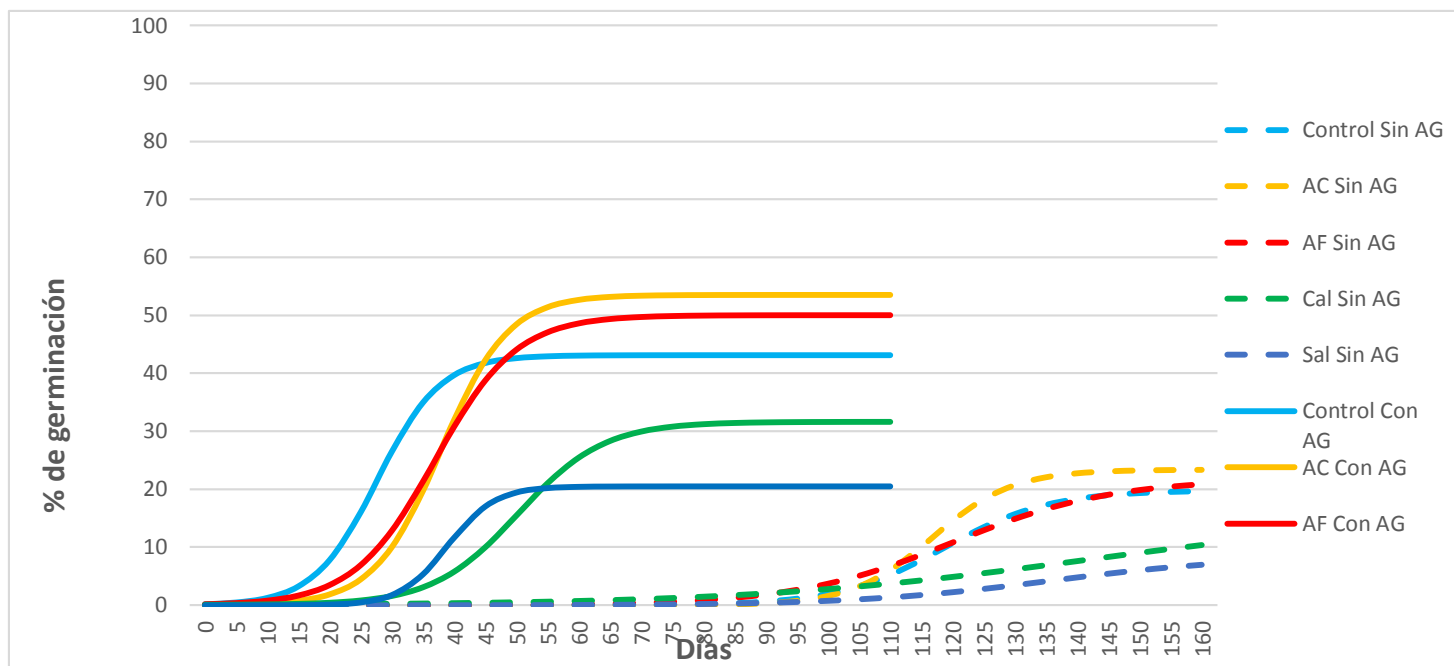


Figura 2. – Modelo logístico ajustados de germinación acumulada. Valores medios para los distintos tratamientos al sustrato, AC (solución de ácido cítrico), AF (solución de ácido fórmico), Cal (solución de pH básico a base de carbonato cálcico) y sal (solución salina) y aplicación de AG

En la tabla 3 se expone el análisis estadístico del porcentaje de germinación acumulada (G, %), y de los valores medios de los parámetros A (%), t_{50} (días) y $k/2$ (d^{-1}).

Tabla 3. – Influencia del tratamiento para modificar el pH y la salinidad del sustrato y de la aplicación de AG, sobre el porcentaje de la germinación acumulada (G, %), de la germinación máxima (A, %), y de los parámetros de germinación, tiempo para alcanzar el 50 % de la germinación (t_{50} , días) y velocidad de germinación ($k/2$, d^{-1}).

		G	A	Gt ₅₀	k/2
Tratamiento (T)	Control	30,50 b	31,46 b	73,28 c	0,0790 a
	Ac. Cítrico (AC)	37,75 a	38,45 a	77,45 c	0,0853 a
	Ac. Fórmico (AF)	35,25 a	35,89 a	78,38 c	0,0829 a
	Cal	22,75 c	23,54 c	96,27 a	0,0457 c
	Salinidad (Sal)	14,25 d	14,47 d	87,52 b	0,0526 b
AG	Sin AG	16,5 b	17,79 b	126,35 a	0,0512 b
	Con AG	39,7 a	39,73 a	38,82 b	0,0870 a
T x AG	Control Sin AG	18,0	19,84	118,51	0,0592
	Control Con AG	43,0	43,08	28,07	0,0989
	AC Sin AG	22,0	23,40	116,56	0,0775
	AC Con AG	53,5	53,50	38,35	0,0932
	AF Sin AG	20,5	21,80	119,64	0,0692
	AF Con AG	50,0	49,97	37,11	0,0966
	Cal Sin AG	14,0	15,50	141,51	0,0184
	Cal Con AG	31,5	31,59	51,23	0,0730
	Sal Sin AG	8,0	8,42	135,72	0,0320
	Sal Con AG	20,5	20,52	39,34	0,0732
Análisis de la varianza		% Suma de cuadrado			
Parámetros (g.l.)					
	T (4)	32,8 **	35,9 **	3,4 **	17,3 **
	AG (1)	59,6 **	56,4 **	95,3 **	44,3 **
	T x AG(4)	5,7 **	5,6 **	0,5 **	14,3 **
	Residual (30)	1,9	2,2	0,8	24,1
	LSD ($P \leq 0,05$)	3,18	3,22	4,41	0,3

Letras diferentes en una columna indican diferencias significativas con ($P \leq 0,05$) según el test LSD.

NS. No significativo

* Nivel de significación ($P \leq 0,05$)

** Nivel de significación ($P \leq 0,01$)

En la tabla 4 se expone el análisis estadístico del porcentaje de viabilidad de las semillas no germinadas al finalizar el ensayo, según el test del tetrazolio.

Tabla 4. – Análisis de la viabilidad de las semillas no germinadas al finalizar el ensayo de modificación del pH y salinidad del sustrato, según el test del tetrazolio.

		Viabilidad (%)	
Tratamiento (T)	Control (C)	35,0 a	
	Ácido Cítrico (AC)	30,0 a	
	Ácido Fórmico (AF)	30,0 a	
	Cal	26,25 ab	
	Salinidad (Sal)	17,5 b	
AG	Sin AG	55,50 a	
	Con AG	0,00 b	
E x AG	Control Sin AG	70,0	
	Control Con AG	0,0	
	AC Sin AG	60,0	
	AC Con AG	0,0	
	AF Sin AG	60,0	
	AF Con AG	0,0	
	Cal Sin AG	52,5	
	Cal Con AG	0,0	
	Sal Sin AG	35,0	
	Sal Con AG	0,0	
	Análisis de la varianza		% Suma de cuadrado
	Parámetros (g.l.)		
	Tratamiento (4)		4,0 **
	AG (1)		89,8 **
T x AG (4)		4,0 **	
Residual (30)		2,3	
LSD ($p \leq 0,05$)		6,20	

Letras diferentes en una columna indican diferencias significativas con ($P \leq 0,05$) según el test LSD.

NS. No significativo

* Nivel de significación ($P \leq 0,05$)

** Nivel de significación ($P \leq 0,01$)

4.2.1. Germinación acumulada (G, %) y máxima (A, %):

El efecto de los tratamientos para modificar el pH y la salinidad, y la adición de AG, tuvieron una influencia significativa ($P \leq 0,01$) sobre A (y G), resultando significativa la interacción entre ambos, de manera que cada uno de ellos explica el 35,9 %, 59,6 % y 5,6 % respectivamente de la variabilidad total.

Se observa que los valores de G y A de los tratamientos de pH de los dos ácidos utilizados (AC y AF) son mayores ($P \leq 0,05$) que los de los otros tratamientos y control, sin diferir ($P \leq 0,05$) entre sí. Los valores de los tratamientos de pH ácido son superiores a los del control ($P \leq 0,05$), mientras que los de pH básico y la salinidad fueron inferiores ($P \leq 0,05$). Los mayores valores de A correspondieron al tratamiento de pH ácido (AC, 53,50 % con AG y 23,40 % sin AG; y AF, 49,97 % con AG y 21,80 % sin AG). El menor valor de A, fue del tratamiento de salinidad, 20,52 % con AG y 8,42 % sin AG. El efecto del AG, ha resultado significativo ($P \leq 0,05$) con valores medios de G (y A) de 39,73 % con AG, y valores de 17,79 % sin AG.

Al analizar la interacción se observa que mientras las diferencias en el porcentaje de germinación de las semillas del control y de los tratamientos AC y AF tratadas con AG han resultado significativas, no lo han sido los valores de estos mismos tratamientos sin AG.

En el ensayo del tetrazolio de las semillas que no habían germinado a la finalización del ensayo, 160 días, (Tabla 4) se observa que las semillas de todos los tratamientos, sin aplicación de AG, presentaban viabilidad. Se observa una viabilidad de las semillas no germinadas similar en el control, AC y AF (30 %), y un porcentaje menor en las semillas de los tratamientos de pH básico (26,25 %) e incluso menor con el tratamiento de salinidad (17,5 %).

Los resultados obtenidos en sustrato con medio ácido superan, evidentemente, a los obtenidos en el experimento de escarificación química con ácido sulfúrico, que como se ha visto anteriormente han dañado probablemente al embrión (Tabla), pero son ligeramente inferiores a los conseguidos al poner las semillas a remojo (Tabla 1). Estos resultados, tal y como se ha visto anteriormente, son comparables a algunos de los citados en la bibliografía [38% Macchia and Casano (1993); 48% Yildirim (1998); 53% Tansi (1999); >50% Rinaldelli (2000) y peores que otros [68% Sozzi y Chiesa (1995) y 80% Orphanos (1983).

4.2.2. Tiempo para alcanzar el 50 % de la germinación, t_{50} (β /k, días)

El efecto de los tratamientos para modificar el pH y la salinidad, y la adición de AG tuvieron una influencia significativa ($P \leq 0,01$) sobre la variable t_{50} , resultando significativa la interacción entre ambos, de manera que cada uno de ellos explica el 3,4 %, 95,3 % y 0,5 % respectivamente de la variabilidad total.

Se observa que el valor del t_{50} de los dos tratamientos ácidos utilizados (AC y AF) son significativamente ($P \leq 0,05$) iguales entre sí y al control, y mayores ($P \leq 0,05$) que los de los otros tratamientos, con mayor valor ($P \leq 0,05$) para el tratamiento salino. El efecto del AG, ha resultado significativo ($P \leq 0,05$) con valores medios de t_{50} de 38,8 días con AG, y 126,4 días sin AG.

Al analizar la interacción se observa que mientras las diferencias en el t_{50} de las semillas del control y de los tratamientos AC y AF tratadas con AG han resultado significativas, no lo han sido estos mismos tratamientos sin AG. Los menores valores de t_{50} , se observaron con el control (28,1 días con

AG y 118,5 días sin AG) y los tratamientos de pH ácido, AC (38,4 días con AG y 116,6 días sin AG) y AF (37,1 días con AG y 119,6 días sin AG). Los mayores valores de t_{50} , se observaron en el tratamiento de pH básico (51,2 días con AG y 141,5 días sin AG).

Se observa que los valores de t_{50} cuando no se ha aplicado AG son muy elevados (superiores a los 100 días), por lo que, si éste es el tiempo necesario para que germine el 50% de las semillas que finalmente han germinado, la duración del ensayo de germinación es excesiva. Aunque es habitual que las semillas de las especies que presentan latencia requieran largos ensayos de germinación de larga duración (Thompson, 1979), lo cierto es que la duración de los ensayos citados anteriormente (30 días Sozzi and Chiesa, 1995; 60 días Tansi, 1999; 60 días Rinaldelli, 2000) es inferior a la de este experimento.

4.2.3. Velocidad de germinación ($k/2$, día⁻¹):

El efecto del tratamiento para modificar el pH y la salinidad y la adición de AG tuvieron una influencia significativa ($P \leq 0,01$) sobre la velocidad de germinación ($k/2$), resultando significativa la interacción entre ambos, de manera que cada uno de ellos explica el 17,3 %, 44,3 % y 14,3 % respectivamente de la variabilidad total.

Los tratamientos al sustrato se comportaron de la misma manera que para el t_{50} . Los valores del parámetro $k/2$ del control y de los tratamientos de pH ácido (AC y AF) no difirieron entre sí ($P \leq 0,05$), resultando mayores ($P \leq 0,05$) que el tratamiento salino, que a su vez fue mayor ($P \leq 0,05$) que el tratamiento básico. El efecto del AG, resultó significativo ($P \leq 0,05$) con valores medios de $k/2$, de 0,0870 d⁻¹ con AG, y 0,0512 d⁻¹ sin AG.

Las mayores velocidades de germinación fueron el control (0,0989 d⁻¹ con AG y 0,0592 d⁻¹ sin AG), el AC (0,0932 d⁻¹ con AG y 0,0775 d⁻¹ sin AG) y el AF (0,0966 d⁻¹ con AG y 0,0692 d⁻¹ sin AG). La menor velocidad fue la del pH básico (0,0184 d⁻¹ con AG y 0,0730 d⁻¹ sin AG).

Al analizar la interacción se observa que mientras las diferencias en el $k/2$ de las semillas del control y de los tratamientos AC y AF tratadas con AG han resultado significativas ($P \leq 0,05$), no lo han sido estos mismos tratamientos sin AG.

4.3 Germinación bajo la influencia de distintas hormonas y de nitrato potásico

La figura 3 representa el modelo logístico ajustado de la germinación acumulada correspondiente a los valores medios del efecto de los diferentes tratamientos.

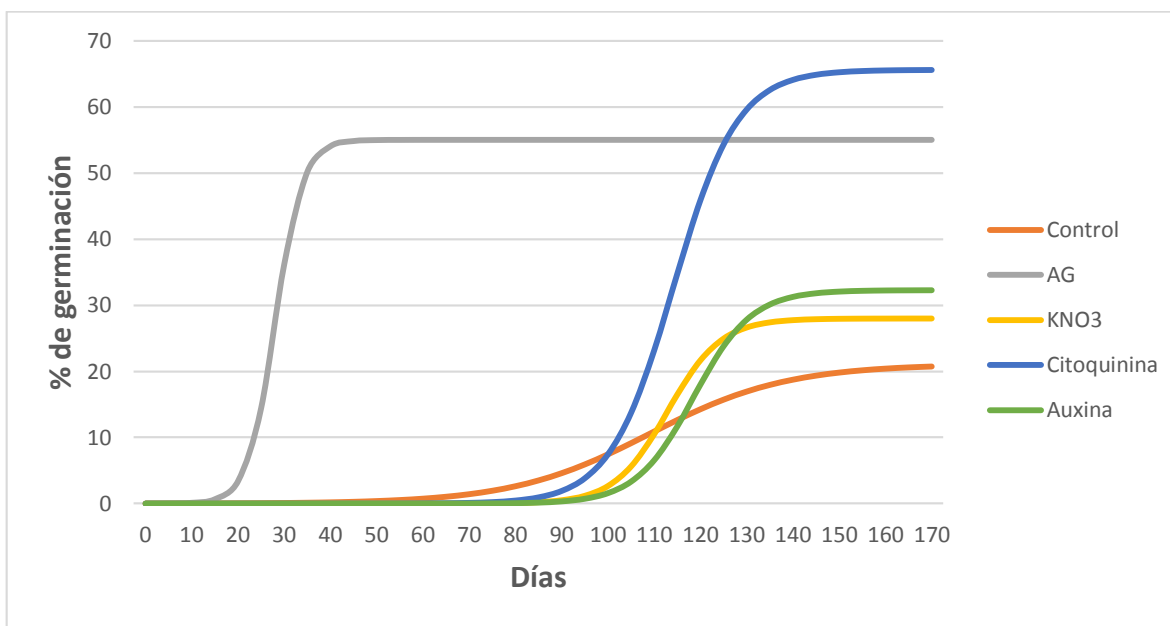


Figura 3. – Modelo logístico ajustados de germinación acumulada. Valores medios para las distintas hormonas, giberelina (AG), citoquinina (benzyl-aminopurine) y auxina (2-4 DP) y KNO_3 .

En la tabla 5 se expone el análisis estadístico del porcentaje de germinación acumulada (G, %), y de los valores medios de los parámetros A (%), t_{50} (días) y $k/2$ (d^{-1}).

Tabla 5. – Influencia de distintas hormonas, giberelina (AG), citoquinina (benzyl-aminopurine) y auxina (2-4 DP) y KNO_3 sobre el porcentaje de la germinación acumulada (G, %), de la germinación máxima (A, %), y de los parámetros de germinación, tiempo para alcanzar el 50 % de la germinación (t_{50} , días) y velocidad de germinación ($k/2$, d^{-1}).

		G	A	Gt_{50}	$k/2$
Hormona	Control	18,0 d	21,09 d	109,11 d	0,0335 c
	Ácido giberélico (AG)	55,0 b	55,00 b	28,64 c	0,1688 a
	Nitrato Potásico (KNO_3)	27,0 c	28,03 c	112,61 bc	0,0871 b
	Citoquinina	63,5 a	65,62 a	114,47 ab	0,0725 bc
	Auxina	30,5 c	31,27 c	118,48 c	0,0799 b
Análisis de la varianza		% Suma de cuadrado			
Parámetros (g.l.)					
Hormona		97,5 **	94,6 **	99,2 **	75,1 **
Residual		2,5	5,1	0,8	24,9

Letras diferentes en una columna indican diferencias significativas con ($P \leq 0,05$) según el test LSD.

En la tabla 6 se expone el análisis estadístico del porcentaje de viabilidad de las semillas no germinadas al finalizar el ensayo, según el test del tetrazolio. El ácido giberélico mostró una vez más una viabilidad nula al acabar el ensayo, es decir que todas las semillas que conservaban la capacidad

Tabla 6. – Análisis de la viabilidad de las semillas no germinadas al finalizar el ensayo de influencia de hormonas y KNO_3 sobre la germinación, según el test del tetrazolio.

Hormona	Viabilidad (%)
Control	55,0 a
Ácido giberélico	0,0 d
Nitrato Potásico	32,5 c
Citoquinina	52,5 a
Auxina	40,0 b

Letras diferentes en una columna indican diferencias significativas con ($P \leq 0,05$) según el test LSD. germinativa, habían germinado.

4.3.1 Germinación acumulada (G, %) y máxima (A, %):

Se observa que, en cuanto a la germinación, G y A, el tratamiento ha resultado tener un efecto significativo ($P \leq 0,01$). La citoquinina, presentó el mayor valor ($P \leq 0,05$) de A (63,5%), superando ($P \leq 0,05$) al de AG (55,0 %), que a su vez ha superado ($P \leq 0,05$) a los de la auxina (30,5%) y el nitrato potásico (27,0), siendo menor ($P \leq 0,05$) el del control (18,0).

El control (55,0 %) y la citoquinina (52,5 %), mostraron un porcentaje de viabilidad al acabar el experimento, superiores a las demás hormonas. La auxina mostró un porcentaje menor (40,0 %) y el nitrato potásico un valor menor a las demás (32,5 %).

Es necesario apuntar la dificultad de interpretar la viabilidad de las semillas en las especies que no existe un mapa topográfico del ensayo del tetrazolio, pero dando como acertada la interpretación del mismo, por haberse realizado con mucho cuidado, se constata que al considerar en las semillas control las semillas germinadas más las viables tras el ensayo de germinación, el porcentaje total de semillas viables era de 64.5%, mientras que el de las tratadas con AG era del 55%; es decir que cabe suponer que el AG afectó negativamente aproximadamente al 10% de las semillas, impidiendo su germinación. La viabilidad total de las semillas tratadas con nitrato potásico (51.4%) y auxina (58.8%), fue similar a la de las semillas control. Mención especial merece el tratamiento con citoquinina, con el que se consiguió el mayor porcentaje de germinación y al mismo tiempo una viabilidad de las semillas germinadas, muy próximo al de las semillas control, por lo que en conjunto supone que el porcentaje total de semillas viables era de 65.5%, superior al de las semillas control, lo que no parece probable, pero sí que permite deducir que el tratamiento con citoquinina no disminuyó la capacidad germinativa de ninguna semilla.

4.3.2. Tiempo para alcanzar el 50 % de la germinación, t_{50} (β /k, días)

En cuanto al t_{50} , el tratamiento ha resultado tener un efecto significativo ($P \leq 0,01$), detectándose diferencias significativas ($P \leq 0,01$) entre todos y cada uno de los tratamientos.

De mayor a menor valor de germinación (A), observamos la citoquinina (65,62 %), el AG (55,00 %), la auxina (31,27 %), el nitrato potásico (28,03 %) y finalmente el control (21,09 %).

Se observa una gran diferencia entre el AG (28,64 días) y las demás hormonas, KNO_3 y control (de 109,11 a 118,48 días). El KNO_3 , la auxina y la citoquinina retrasaron un poco el inicio de la germinación respecto al control. El t_{50} menor fue el AG (28,64 días) y el t_{50} mayor correspondió a la auxina (118,48 días).

4.3.3 Velocidad de germinación ($k/2$, día⁻¹):

En cuanto al $k/2$ el tratamiento tuvo un efecto significativo ($P \leq 0,01$). La mayor velocidad de germinación ($P \leq 0,05$) fue la del AG (0,1688 d⁻¹), la menor velocidad fue el control (0,0335 d⁻¹). El KNO_3 , la citoquinina, las auxinas mostraron valores ($P \leq 0,05$) de $k/2$ estadísticamente iguales, menores que el del AG y mayores que el del control.

4.4 Evolución del poder germinativo con la edad de las semillas

La germinación de las semillas recolectadas en los años 2011 y 2012 fue nula, por lo que no se añadieron al análisis estadístico, por no cumplir la hipótesis de normalidad. No está claro el motivo de este resultado, puesto que semillas recolectadas en 2010 obtuvieron un valor de G apreciable (40% con AG), habiendo sido conservadas en idénticas condiciones. Resulta evidente las diferencias existentes entre los diferentes lotes de semillas. Al realizar el ensayo del tetrazolio en semillas control correspondientes a cada año, como se verá más adelante, constatan la no viabilidad de las semillas producidas en 2011 y 2012. Resulta evidente las diferencias existentes entre los diferentes lotes de semillas.

La figura 4 representa el modelo logístico ajustado a la germinación acumulada correspondiente a los años de recolección de las semillas (2010, 2013 y 2014) con y sin AG. Al igual que en los experimentos anteriores, el AG adelantó la germinación.

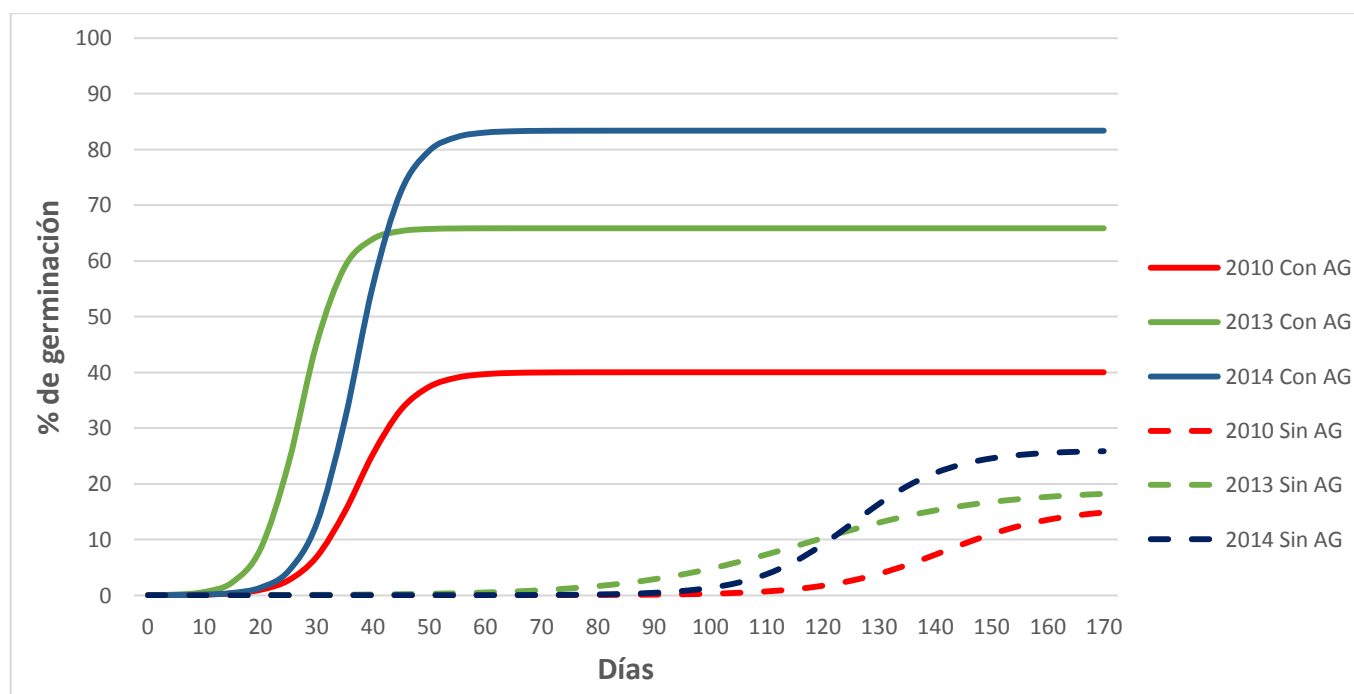


Figura 4. – Modelo logístico ajustado de germinación acumulada. Valores medios para en ensayo de germinación de distintos años de recolección de las semillas (2010, 2013 y 2014) y aplicación de AG.

En la tabla 7 se expone el análisis estadístico del porcentaje de germinación acumulada (G, %), y de los valores medios de los parámetros A (%), t_{50} (días) y $k/2$ (d^{-1}).

Tabla 7. - Efecto de la edad de las semillas y de la aplicación de ácido giberélico, sobre el porcentaje de la germinación acumulada (G, %), de la germinación máxima (A, %), y de los parámetros de germinación, tiempo para alcanzar el 50 % de la germinación (t_{50} , días) y velocidad de germinación ($k/2$, d^{-1}).

		G	A	Gt_{50}	$k/2$
Año (E)	2010	26,75 c	27,90 c	89,28 a	0,0774 -
	2013	42,0 b	42,33 b	72,69 c	0,0837 -
	2014	54,25 a	54,70 a	81,88 b	0,0887 -
AG	Sin AG	18,83 b	20,20 b	128,42 a	0,0461 b
	Con AG	63,17 a	63,09 a	34,14 b	0,1205 a
Año x AG	2010 Sin AG	13,5	15,75	141,57	0,0490
	2010 Con AG	40,0	40,05	37,00	0,1057
	2013 Sin AG	18,0	18,82	117,33	0,0315
	2013 Con AG	66,0	65,84	28,04	0,1359
	2014 Sin AG	25,0	26,03	126,37	0,0577
	2014 Con AG	83,5	83,37	37,40	0,1198
Análisis de la varianza		% Suma de cuadrado			
Parámetros (g.l.)					
Año (2)		17,6 **	17,5 **	2,0 **	0,9 NS
AG (1)		68,3 **	67,2 **	96,4 **	58,4 **
Año x AG (2)		6,2 **	7,0 **	0,6 *	4,8 NS
Residual (18)		8,0	8,4	1,0	35,9
LSD ($p \leq 0,05$)		6,21	6,21	4,96	-

Letras diferentes en una columna indican diferencias significativas con ($P \leq 0,05$) según el test LSD.

NS. No significativo

* Nivel de significación ($P \leq 0,05$)

** Nivel de significación ($P \leq 0,01$)

En la tabla 8 se expone el análisis estadístico del porcentaje de viabilidad de las semillas no germinadas al finalizar el ensayo. El ácido giberélico mostró una vez más una viabilidad nula al acabar el ensayo, es decir que todas las semillas que conservaban la capacidad germinativa, habían germinado.

Tabla 8. – Análisis de la viabilidad de las semillas no germinadas al finalizar el ensayo de la influencia de la edad de las semillas, según el test del tetrazolio.

		Viabilidad (%)
Año	2010	18,75 c
	2013	23,75 b
	2014	37,50 a
AG	Sin AG	53,33 a
	Con AG	0,00 b
Año x AG	2010 Sin AG	37,5
	2010 Con AG	0,0
	2013 Sin AG	47,5
	2013 Con AG	0,0
	2014 Sin AG	75,0
	2014 Con AG	0,0

Análisis de la varianza	% Suma de cuadrado
Parámetros (g.l.)	
Año (2)	24,3 **
AG (1)	29,9 **
Año x AG (2)	24,3 **
Residual (30)	0,7
LSD ($p \leq 0,05$)	4,67

Letras diferentes en una columna indican diferencias significativas con ($P \leq 0,05$) según el test LSD.

NS. No significativo

* Nivel de significación ($P \leq 0,05$)

** Nivel de significación ($P \leq 0,01$)

En la tabla 9, se expone el porcentaje de viabilidad de las semillas de los diferentes años antes de ponerlas a germinar, según el test del tetrazolio. Observamos que la viabilidad va disminuyendo con la edad. Las semillas de los años 2011 y 2012 eran en efecto no viable.

Tabla 9. – Análisis de la viabilidad de las semillas de los distintos años de recolección (2010, 2011, 2012, 2013 y 2014) antes de empezar el ensayo de germinación, según el test del tetrazolio.

		Viabilidad (%)
Año	2010	65,0 c
	2011	0,0 d
	2012	0,0 d
	2013	77,5 b
	2014	97,5 a

Letras diferentes en una columna indican diferencias significativas con ($P \leq 0,05$) según el test LSD.

4.4.1. Germinación acumulada (G, %) y máxima (A, %):

El efecto del año de recolección y la adición de AG tuvieron una influencia significativa ($P \leq 0,01$) ($P \leq 0,01$) sobre las variables G y A, resultando significativa la interacción entre ambos, de manera que cada uno de ellos explica el 17,5 %, 6,5 % y 7,0 %, respectivamente de la variabilidad total.

El valor medio de la germinación, A y G, fue significativamente distinta para los tres años estudiados, se observa que en 2014 (54,52 %) fue mayor ($P \leq 0,05$) a la de 2013 (42,33 %), que a su vez fue mayor ($P \leq 0,05$) a la de 2010 (27,90 %).

El mayor valor de las variables G y A fue del año de recolección 2014 (83,37 % con AG, y 26,03 % sin AG), el menor valor fue el año 2010, (40,05 % con AG y 15,75 % sin AG).

El efecto del AG, ha resultado significativo ($P \leq 0,05$) con valores de G (y A) de 63,09 % con AG, y valores de 20,20 % sin AG.

Al analizar la interacción se observa que mientras las diferencias en los valores de G y A, de las semillas del 2010 y 2013 tratadas con AG han resultado significativas, no lo han sido en estos mismos años sin AG.

4.4.2. Tiempo para alcanzar el 50 % de la germinación, t_{50} (β/k , días)

El efecto del año de recolección y la adición de AG tuvieron una influencia significativa ($P \leq 0,01$) sobre la variable t_{50} , resultando significativa ($P \leq 0,05$) la interacción entre ambos, explicando el 2,0 %, 96,4 % y 0,6 % respectivamente de la variabilidad total.

Se observan diferencias significativas ($P \leq 0,05$) entre el t_{50} de los tres años de recolección. Presentando el año de recolección 2013 un valor de t_{50} , inferior a los otros dos años estudiados, siendo el año 2013 el más adelantado (72,69 días), luego el año 2014 (72,69 días) y finalmente el año 2010 (89,28 días).

El AG adelantó el tiempo de germinación en todos los casos, habiendo una diferencia entre el uso o no de AG, muy importante (además de significativa; $P \leq 0,01$) para el t_{50} , con una diferencia media de 34,14 días, con AG, frente 128,42 días, sin AG.

El año con menor valor de t_{50} fue el año 2013 (28,04 días con AG y 117,33 días sin AG), el año más retrasados fue 2010 (34,14 días con AG y 141,57 días sin AG).

Al analizar la interacción se observa que mientras las diferencias en la t_{50} de las semillas de los tres años no tratadas con AG, han resultado significativas ($P \leq 0,05$), en las semillas tratadas con AG no han existido diferencias ($P \leq 0,05$) entre los valores de las semillas de 2010 y 2014.

4.4.3. Velocidad de germinación ($k/2$, día⁻¹):

Únicamente el uso de AG resultó significativo ($P \leq 0,01$) en cuanto a $k/2$ (representando el 58,4 % de la variabilidad total), con valores medios de 0,1205 d⁻¹ con AG, y 0,0,0461 d⁻¹ sin AG.

No se observan diferencias significativas entre los distintos años de recolección para el parámetro $k/2$.

La viabilidad de las semillas no germinadas al finalizar el experimento, que habían sido tratadas con AG fue nula para los tres años estudiados, es decir que todas las semillas con capacidad de germinar lo habían hecho durante el ensayo de germinación. En cambio, las semillas no germinadas y no tratadas con AG, todavía presentaban capacidad de germinación (valores de viabilidad de 75% para el año 2014, 47,5% para el año 2013 y 37,5 % para el año 2010).

El análisis de viabilidad de las semillas antes de realizar ningún tratamiento constata que las semillas recolectadas en el año 2014 presentan un porcentaje de viabilidad muy alto (97,5 %), las del año 2013 presentan un valor menor (83,37 %) y las del año 2010 presenta un valor menor (77,5 %), estando totalmente de acuerdo con los resultados del ensayo de germinación. Al mismo tiempo se observa todas las semillas recolectadas en los años 2011 y 2012 eran no viables.

4.5 Poder germinativo de las semillas procedentes de diferente material vegetal

La germinación de las semillas comerciales (*Capparis spinosa*) fue nula, por lo que no se añadieron al análisis estadístico, por no cumplir la hipótesis de normalidad. Este resultado es extraño, dado que en la fecha del ensayo las semillas teóricamente las semillas eran viables, por lo que se repitió el ensayo con semillas de otro envase, con idéntico resultado.

La figura 5 representa el modelo logístico ajustado a la germinación acumulada de semillas de *Capparis spinosa* subsp. *rupestris* (CSR) y *Capparis spinosa* subsp. *spinosa* (ASS), con y sin aplicación de AG.

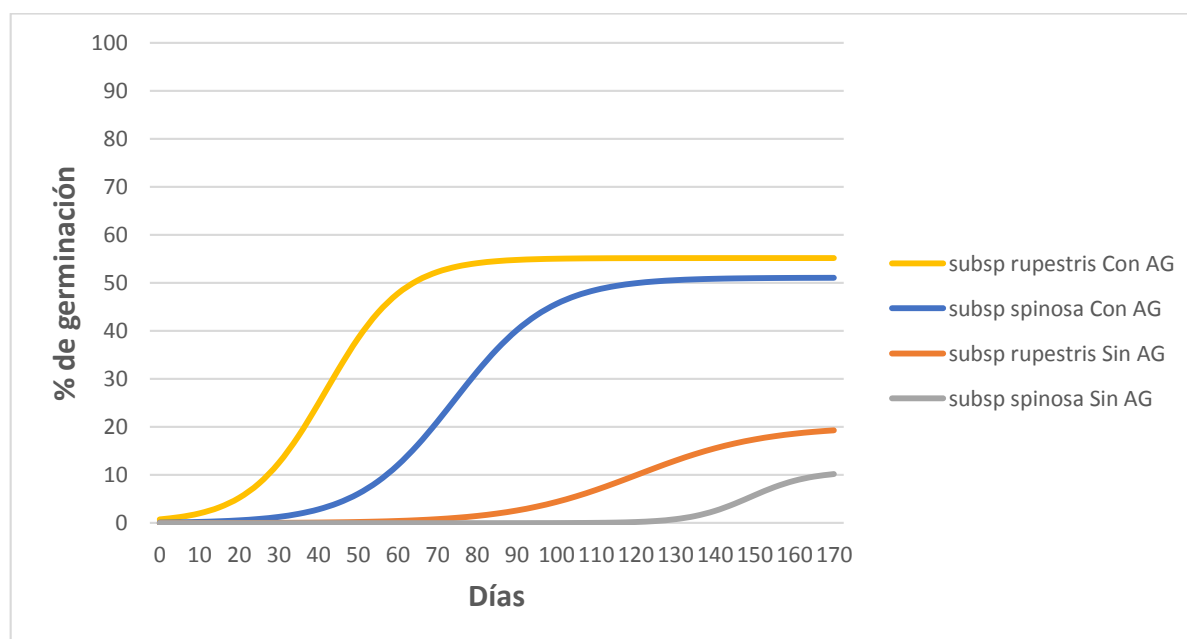


Figura 5. – Modelo logístico ajustado de germinación acumulada. Valores medios del ensayo de germinación para los distintos materiales vegetales (*Capparis spinosa* subsp *rupestris* y subsp *spinosa*) y aplicación de AG.

En la tabla 10 se expone el análisis estadístico del porcentaje de germinación acumulada (G, %), y de los valores medios de los parámetros A (%), t_{50} (días) y $k/2$ (d^{-1}).

Tabla 10. – Efecto de los diferentes materiales vegetales y de la aplicación de ácido giberélico en la germinación de las semillas de alcaparra, sobre el porcentaje de la germinación acumulada (G, %), de la germinación máxima (A, %), y de los parámetros de germinación t_{50} (d) y $K/2$ (d^{-1}).

		G	A	Gt_{50}	$k/2$
Materia vegetal (MV)	subsp. <i>rupestris</i>	37,0 a	37,66 a	80,91 b	0,0413 -
	subsp. <i>spinosa</i>	30,0 b	30,98 b	112,68 a	0,0538 -
AG	Sin AG	14,0 b	15,51 b	134,57 a	0,0487 -
	Con AG	53,0 a	53,13 a	59,02 b	0,0464 -
MV x AG	subsp <i>rupestris</i> Sin AG	19,0	20,15	119,45	0,0311
	subsp <i>rupestris</i> Con AG	55,0	55,17	42,37	0,0515
	subsp <i>spinosa</i> Sin AG	9,0	10,86	149,69	0,0663
	subsp <i>spinosa</i> Con AG	51,0	51,10	75,67	0,0412
Análisis de la varianza		% Suma de cuadrados			
Parámetros (g.l.)					
	MV (1)	3,0 **	3,0 **	14,8 **	0,4 NS
	AG (1)	93,6 **	93,8 **	83,5 **	11,1 NS
	MV 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
	LSD ($p>0,05$)	-	-	-	-

Letras diferentes en una columna indican diferencias significativas con ($P \leq 0,05$) según el test LSD.

NS. No significativo

* Nivel de significación ($P \leq 0,05$)

** Nivel de significación ($P \leq 0,01$)

En la tabla 11 se expone el análisis estadístico del porcentaje de viabilidad de las semillas no germinadas al finalizar el ensayo.

Tabla 11. – Análisis de la viabilidad de las semillas no germinadas al finalizar el ensayo.

		Viabilidad (%)
Material Vegetal	subsp <i>rupestris</i>	21,25 a
	subsp <i>spinosa</i>	23,75 a
	<i>C. spinosa</i> Comercial	0,0 b
AG	Sin AG	45,00 a
	Con AG	0,00 b
MV x AG	subsp <i>rupestris</i> Sin AG	42,5
	Subsp <i>rupestris</i> Con AG	0,0
	subsp <i>spinosa</i> Sin AG	47,5
	subsp <i>spinosa</i> Con AG	0,0

Análisis de la varianza Parámetros (g.l.)	% Suma de cuadrado
MV (1)	24,3 **
AG (1)	48,2 **
MV x AG (1)	24,3 **
Residual (18)	3,1
LSD (p>0,05)	4,41

Letras diferentes en una columna indican diferencias significativas con ($P \leq 0,05$) según el test LSD.

NS. No significativo

* Nivel de significación ($P \leq 0,05$)

** Nivel de significación ($P \leq 0,01$)

En la tabla 12 se expone análisis de la viabilidad de las semillas de las subespecies *rupestris* y *spinosa*, y de semilla comercial (*C. spinosa*) antes de realizar el ensayo de germinación.

Tabla 12. – Análisis de la viabilidad de las semillas de las subespecies *rupestris* y *spinosa*, y de semilla comercial (*C. spinosa*) antes de realizar el ensayo de germinación.

		Viabilidad (%)
Material Vegetal	subsp <i>rupestris</i>	72,5 a
	subsp <i>spinosa</i>	75,0 a
	<i>C. spinosa</i> Comercial	0,0 b

Letras diferentes en la columna indican diferencias significativas con ($P \leq 0,05$) según el test LSD.

4.5.1. Germinación acumulada (G, %) y máxima (A, %):

El efecto del material vegetal y la adición de AG tuvieron una influencia significativa ($P \leq 0,01$) sobre las variables G y A, de manera que cada uno de ellos explica el 3,0 %, 93,6 %, respectivamente de la variabilidad total. La interacción entre ambos no fue significativa. El valor medio de A correspondiente a CSR (37,66 %; 55,17 % con AG y 20,15 % sin AG) fue mayor que el de CSS (30,98 %; 51,10 % con AG y 10,86 % sin AG). El AG mejoró significativamente ($P \leq 0,01$) la G y A, con una media de 53,13 % con AG y 15,51 % sin AG.

Convendría destacar que las semillas de la subespecie *spinosa*, no tratadas con AG germinaron muy tarde, comenzando su germinación cuando se terminó el ensayo, por lo que probablemente hubiera seguido germinando e incrementando su bajo porcentaje de germinación.

La viabilidad de las semillas no germinadas al finalizar el experimento, que habían sido tratadas con AG fue nula para los tres materiales vegetales, es decir que todas las semillas con capacidad de germinar lo habían hecho durante el ensayo de germinación. En cambio, las semillas no germinadas y no tratadas con AG, todavía presentaban capacidad de germinación (valores de viabilidad de 21,25% en la subespecie *rupestris* y 23,75 % en la subespecie *spinosa*).

El análisis de viabilidad de las semillas antes de realizar ningún tratamiento constata que las semillas de las subespecies *rupestris* y *spinosa* presentan prácticamente el mismo porcentaje de viabilidad (75,0 y 72,5 %), a pesar de que la primera haya obtenido un mayor valor de A, aunque como se ha indicado probablemente la germinación de las semillas de la subespecie *spinosa* es más lenta que la de la subespecie *rupestris*, y por tanto puede que necesite una mayor duración del ensayo para alcanzar valores similares. Al mismo tiempo se observa todas las semillas comerciales eran no viables.

4.5.2. Tiempo para alcanzar el 50 % de la germinación, t_{50} (β/k , días)

El efecto del material vegetal y la adición de AG tuvieron una influencia significativa ($P \leq 0,01$) sobre la t_{50} , explicando el 14,8 % y 83,5 % respectivamente de la variabilidad total. La interacción entre ambos no fue significativa. La subespecie *rupestris* presentó un valor medio de t_{50} de 80,91 días, muy inferior a la subespecie *spinosa* (112,68 días).

El AG adelantó significativamente la t_{50} , con una media de 59,1 días con AG y 134,6 días sin AG. La subespecie *rupestris* presentó una germinación más rápida (menor t_{50}) que la subespecie *spinosa*, tanto con (42,4 vs. 75.7 días) como sin (119,69 vs. 149.7 días) AG.

4.5.3. Velocidad de germinación ($k/2$, día⁻¹):

Ni el material vegetal, ni la utilización del AG, ni la interacción de ambos afectaron ($P \leq 0,05$) a la velocidad de germinación.

6 Conclusiones

Dentro de los rangos de los valores de los factores ensayados se concluye:

- El tratamiento de remojo de las semillas mejora ligeramente la germinación, al reblandecer las cubiertas de las mismas.
- El tratamiento de alternancia de humedad del sustrato de germinación mejora ligeramente el porcentaje y la velocidad de germinación, aunque sería interesante replantear el ensayo.
- Las semillas de *Capparis spinosa* germinan mejor en un medio ácido.
- El ácido giberélico mejora considerablemente el porcentaje y la velocidad de germinación.
- Una exposición excesiva a una dosis alta de AG puede dañar al embrión.
- Las citoquininas mejoran el porcentaje de germinación pero no la velocidad de germinación.
- Las semillas mantienen una viabilidad alta durante dos años, pero va decayendo después. A los cinco años, un porcentaje apreciable de las semillas siguen viables.
- La subespecie *spinosa* presenta una germinación más lenta que la subespecie *rupestris*.

7 Bibliografía

BARBERA G. (ed.) (1991). Le câprier (*capparis* spp.). *Rapport Commission des Communautés européennes*. 1-62.

BESNIER F. (1989). *SEMILLAS. Biología y tecnología*. Ediciones Mundi-Prensa. 637 pp.

DOMÍNGUEZ N. (2013) *Estudio para la mejora de la propagación sexual de la alcaparra (capparis spinosa L.)*. Tesina de máster. Escuela Técnica Superior de Ingeniería Agronómica y del Medio Natural. Valencia. 64 pp.

FARHOUDI R.; TAFTI M. M. (2013). The Effect of Seed Dormancy Breaking Methods on Caper (*capparis spinosa* L.) Germination and Growth. *Scientific Journal of Agronomy and Plant Breeding*. N° 1(1): 20-25.

GHORBEL A.; BEN SALEM-FNAYOU A.; KHOULDI S.; SKOURI S.; CHIBANI F. (2001). Le câprier. Caractérisation et multiplication, en: *Des modèles biologiques à l'amélioration des plantes*. Ird/orstom: 157-172.

HARTMANN H. T.; KESTER D. E.; DAVIES F. T., JR; GENEVE R. L. (2011). *Hartmann & Kester's Plant Propagation. Principles and Practices*. 8ª Ed. Pearson Education, Inc. 915 pp.

HEYDARIYAN M. (2014). Effect of Seed Priming on Germination and Seedling Growth of the Caper (*Capparis Spinosa*) under Drought Stress. *Int. J. Adv. Biol. Biom. Res.* N° 2 (8): 2381-2389.

IMBERNÓN MORA A. (2000). *Mejora de las técnicas de propagación sexual y vegetativa de la alcaparra*. Trabajo de Fin de Carrera. Escuela Técnica Superior de Ingenieros Agronomos. Valencia. 150 pp.

KAYA T.; SÖYLER D. A.; ÖZCAN S. (2014). Effect of Pre-Chilling Duration and Kinetin on Germination of Capers (*Capparis spinosa* and *Capparis ovata* var. *canescens*) Seeds. *Turkish Journal of Agricultural and Natural Sciences*. N°2: 2092-2097.

KHANINEJAD S.; AREFI I. H.; KAFI M. (2012). Effect of Priming on Dormancy Breaking and Seedling Establishment of Caper (*Capparis spinosa* L.). *International Conference on Applied Life Sciences, Turquía, 10-12 septiembre 2012*: 365-370.

LOZANO PUCHE J. (1977). El alcaparro. *Hojas Divulgadoras*. N°19-77HD: 1-16.

LUNA LORENTE F.; PÉREZ VICENTE M. (1985). *La tapenera o alcaparra. Cultivo y aprovechamiento*. PUBLICACIONES DE EXTENCION AGRARIA. 127 pp.

MACCHIA, M. AND CASANO, S. (1993) La propagazione del capperò (*Capparis spinosa* L.). *Sementi Elette*, 39, 39-42.

MAROTO J. V. (2002). *Horticultura Herbácea Especial*. 5ª Ed. Ediciones Mundi-Prensa. 702 pp.

- MASCARÓS CAMPOS S. (2010). *Experimentos para la mejora de la propagación sexual de la alcaparra*. Trabajo Final de Carrera. Escuela Técnica Superior de Ingeniería Agronómica y del Medio Natural. Valencia. 74 pp.
- MOORE R. P. (1985). *Manual de Ensayos al Tetrazolio*. M.A.P.A. 92 pp.
- NUEZ F.; LLÁCER G. (eds.) (2001). *La Horticultura Española*. EDICIONES DE HORTICULTURA, S.L. 491 pp.
- ÖLMEZ Z.; YAHYAOĞLU Z.; ÜÇLER A. Ö. (2004). Effects of H₂SO₄ and GA₃ Treatments on Germination of Caper (*Capparis ovata* Desf.) Seeds. *Pakistan Journal of Biological Sciences*. N°7: 879-882.
- ÖLMEZ Z.; YAHYAOĞLU Z.; ÜÇLER A. Ö. (2004). Effects of Stratification and Chemical Treatments on Germination of Caper (*Capparis ovata* Desf.) Seeds. *Agr. Med.* N°134: 101-106.
- ORPHANOS, P.I. (1983) Germination of caper (*Capparis spinosa* L.) seeds. *Journal of Horticultural Science*, 58, 267-270.
- PASCUAL, B; SAN BAUTISTA A., PASCUAL-SEVA, N. (2009a). *Propagación Vegetal*. UPV-583. Valencia.
- PASCUAL, B., SAN BAUTISTA, A., IMBERNÓN, A., LÓPEZ-GALARZA, S., ALAGARDA, J. AND MAROTO, J.V. (2004). Seed treatments for improved germination of capers. *Seed Sci. & Technol.* N°32: 637-642.
- PASCUAL, B., SAN BAUTISTA, A., LOPEZ-GALARZA, S., ALAGARDA, J., MAROTO, J. V. (2006b) Germination behaviour after storage of caper seeds. *Seed Sci. & Technol.* N°34: 151-159.
- PASCUAL, B., SAN BAUTISTA, A., PASCUAL SEVA, N., GARCIA MOLINA, R., LOPEZ-GALARZA, S., MAROTO, J. V. (2009). Effects of soaking period and gibberellic acid addition on caper seed germination. *Seed Sci. & Technol.* N°37: 33-41.
- PASCUAL, B., SAN BAUTISTA, A., IMBERNÓN, A., LÓPEZ-GALARZA, S., ALAGARDA, J. AND MAROTO, J.V. (2004). Seed treatments for improved germination of caper (*Capparis spinosa* L.). *Seed Science and Technology*, 32, 637-642.
- RECHE MÁRMOL J. (1967). Cultivo del alcaparro o tapanera. *Hojas Divulgadoras*. N°14-67H: 1-15.
- RINALDELLI, E. (2000) Effect of ultrasonic waves on seed germination of *Capparis spinosa* L. as related to exposure time, temperature, and gibberellic acid. *Advances in Horticultural Science*, 14, 182-188.
- SAIFI N. (2014). Aptitude à la rhizogenèse et à la germination de quelques écotypes marocains du câprier. *ScienceLib*. Editions Mersenne. Vol. 6, n° 141201.
- SOZZI G. O.; CHIESA A. (1995). Improvement of caper (*Capparis spinosa* L.) seed germination by breaking seed coat-induced dormancy. *Scientia Horticulturae*. N°62: 255-261.
- TANSI, S. (1999) Propagation methods for caper (*Capparis spinosa* L.) seeds. *Agricoltura Mediterránea*, 23, 45-49.

YILDIRIM, Z. (1998) Studies on the improvement of seed germination in caper. *Turk Journal of Field Crops*, 3, 21-24.