



UNIVERSIDAD POLITÉCNICA DE CARTAGENA

**ESCUELA TÉCNICA SUPERIOR DE INGENIERÍA AGRONÓMICA
DEPARTAMENTO DE PRODUCCIÓN AGRARIA**

**INGENIERO TÉCNICO AGRÍCOLA, esp. HORTOFRUTICULTURA Y
JARDINERÍA**

PROYECTO FIN DE CARRERA:

**“MÉTODOS DE PROPAGACIÓN SEXUAL Y VEGETATIVA DE *Ziziphus
lotus* (L.) Lam: ENSAYOS DE GERMINACIÓN DE SEMILLAS Y
ENRAIZAMIENTO DE ESQUEJES”**

Realizado por:

Óscar Rubén Conesa Noguera

Dirigido por:

D. Juan José Martínez Sánchez
Dña. Encarnación Conesa Gallego

Cartagena, Septiembre de 2006

ÍNDICE GENERAL

RESUMEN	5
1. INTRODUCCIÓN	8
1.1 ENCUADRE TAXONÓMICO Y DESCRIPCIÓN BOTÁNICA	9
1.1.1 Características botánicas.....	9
1.1.2 Adaptaciones.....	10
1.1.3 Hábitat y ecología.....	12
1.1.4 Conservación.....	15
1.2 ESTUDIO DE LA GERMINACIÓN	18
1.2.1 Concepto de germinación.....	18
1.2.2 Fases de la germinación.....	20
1.2.3 Estructura de las semillas.....	20
1.2.4 Ecología de la germinación.....	21
1.2.4.1 Factores abióticos o físicos.....	22
1.2.4.2 Factores bióticos.....	24
1.2.5 Concepto de latencia o letargo.....	25
1.2.5.1 Tipos de letargo.....	25
1.2.5.2 Otros tipos de letargo.....	28
1.2.5.3 Factores del letargo.....	30
1.2.5.4 Factores generales para la germinación.....	30
1.2.5.5 Inhibidores y estimuladores. Mecanismos para romper la latencia.....	32
1.2.5.6 Causas del letargo.....	36
1.2.6 Significado ecológico de la latencia y la germinación.....	36

1.3 ESTUDIO DE LA REPRODUCCIÓN POR ESQUEJES.....	39
1.3.1 Introducción.....	39
1.3.2 Influencia de la posición del esqueje y de la aplicación hormonal.....	45
1.3.3 Estudio de la concentración de ácido indolbutírico (AIB) en el enraizamiento de esquejes	47
1.4 ESTUDIO DEL CRECIMIENTO RADICAL.....	48
2. OBJETIVOS.....	50
3. MATERIAL Y MÉTODOS.....	53
3.1 ENSAYOS DE GERMINACIÓN.....	54
3.1.1 Ensayo de viabilidad de semillas: Test de Tetrazolio	55
3.1.2 Ensayo de semillas fuera del fruto	58
3.1.3 Ensayos en distintos sustratos bajo invernadero	62
3.1.4 Ensayo a distintas temperaturas bajo sustrato	65
3.1.5 Ensayo de escarificación térmica.....	67
3.1.6 Ensayos de estratificación.....	69
3.1.6.1 Primer ensayo: Estratificación fría con alternancia de temperaturas 4°-20° C.....	69
3.1.6.2 Segundo ensayo: Estratificación fría seca y húmeda durante dos meses.....	71
3.2 ENSAYOS DE ENRAIZAMIENTO POR ESQUEJES.....	74
3.2.1 Primer ensayo (Octubre 2005).....	75
3.2.2 Segundo ensayo (Enero 2006).....	80
3.2.3 Tercer ensayo (Febrero 2006).....	83
3.2.4 Cuarto ensayo (Marzo 2006).....	85
3.3 ESTUDIO DEL CRECIMIENTO RADICAL Y PARTE AÉREA EN DISTINTOS SUSTRATOS.....	89

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	96
4.1 ENSAYOS DE GERMINACIÓN	97
4.1.1 Ensayo de viabilidad de semillas: Test de tetrazolio.....	95
4.1.2 Ensayo de semillas fuera del fruto.....	99
4.1.3 Ensayo en distintos sustratos bajo invernadero.....	103
4.1.4 Ensayo a distintas temperaturas bajo sustrato.....	106
4.1.5 Ensayo de escarificación térmica.....	108
4.1.6 Ensayos de estratificación.....	110
4.1.6.1 Primer ensayo: Estratificación fría con alternancia de temperaturas 4-20°C.....	110
4.1.6.2 Segundo ensayo: Estratificación fría seca y húmeda durante dos meses.....	110
4.2 ENSAYOS DE ENRAIZAMIENTO POR ESQUEJES	111
4.2.1 Primer ensayo (Octubre 2005).....	112
4.2.2 Segundo ensayo (Enero 2006).....	114
4.2.3 Tercer ensayo (Febrero 2006).....	118
4.2.4 Cuarto ensayo (Marzo 2006).....	120
4.3 ESTUDIO DEL CRECIMIENTO RADICAL Y PARTE AÉREA EN DISTINTOS SUSTRATOS	122
5. CONCLUSIONES GENERALES	132
6. BIBLIOGRAFÍA	135

RESUMEN

El presente proyecto estudió diferentes aspectos de la reproducción por esquejes de *Ziziphus lotus* (L.) Lam, planta característica de la mitad meridional de la Región de Murcia, así como aspectos relacionados con la germinación de dicha especie. Igualmente, estudió el crecimiento radical de esta especie en distintos sustratos.

La propagación por esquejes es una técnica reproductiva de gran interés en la industria viverística. Por ello, se investigó la influencia de diversos factores que afectan a la misma antes y después de la obtención de los esquejes. En primer lugar se estudió la capacidad de enraizamiento de los esquejes según su posición en la planta, y las posibilidades de modificación de dicha capacidad mediante la aplicación exógena de auxinas (ácido indolbutírico). Los resultados obtenidos no mostraron enraizamiento alguno, pero en cuanto a la brotación y respuesta de los esquejes, los de tallos más grueso fueron los más resistentes. Por lo tanto, en este ensayo la aplicación de ácido indolbutírico (AIB) fue inefectiva.

A la misma vez se realizó el estudio de diversas concentraciones de ácido indolbutírico aplicado en los esquejes, para promover el enraizamiento, pero igual que el anterior, el enraizamiento radical fue nulo. Únicamente se obtuvieron resultados, pero sólo en forma de callo, utilizando concentraciones de 25 ppm de hormona aplicadas durante 48 horas en la base de los esquejes.

Debido a la nula reproducción obtenida por esquejes de esta planta, se realizaron diferentes ensayos de germinación con semillas sin fruto y con huesos para intentar averiguar con que tipo de proceso se eliminaba el letargo de las semillas y se alcanzaban porcentajes más elevados de germinación.

En estos ensayos de germinación realizados, sólo se han obtenido porcentajes elevados en las semillas sin fruto, mientras que en los ensayos en los que se utilizó huesos de *Ziziphus lotus*, ni la escarificación, ni la estratificación fría en húmedo y en seco, ni los ensayos en distintos sustratos dieron resultados elevados de germinación. Esto nos hace ver que hay un gran impedimento físico

para la germinación de las semillas impuesto por el hueso que contiene las semillas.

Ziziphus lotus es una planta de gran interés en proyectos de revegetación en la zona de la Región de Murcia y en el litoral mediterráneo, por lo que el transplante y la fase de establecimiento son críticos para lograr el éxito. En el arco mediterráneo uno de los factores limitantes al crecimiento de las plantas es el suelo. Entre otros factores, los sustratos habitualmente empleados en la producción de plantas influyen sobre el comportamiento de las mismas en el transplante en el terreno definitivo, especialmente en lo que se refiere a una mayor eficiencia en el uso de los recursos disponibles. Adicionalmente, el medio físico suele ser un factor limitante y estresante que repercute sobre el desarrollo de las plantas.

Bajo estas consideraciones, se ha planteado el tercer estudio en el que se plantean los efectos del medio físico, y de sus propiedades físicas, sobre el desarrollo radical de plántulas procedentes de la propagación por esquejes como medio de evaluación de su idoneidad para trabajos de revegetación y xerojardinería. El empleo de sustratos de tierra, ha sido el que más posibilidades de desarrollo de las plántulas ha dado, mostrando un gran desarrollo del sistema radicular en profundidad, en contra de sustratos orgánicos como la turba, en los que quizás su menor capacidad de intercambio catiónico o su bajo pH, impida un buen crecimiento del sistema radicular y por consiguiente un menor crecimiento de la parte aérea.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 ENCUADRE TAXONÓMICO Y DESCRIPCIÓN BOTÁNICA

1.1.1 Características botánicas

La especie *Ziziphus lotus* (L.) Lam pertenece a la familia *Rhamnaceae*, género *Ziziphus*. Dicha especie también es conocida como Arto o Azufaifo. Esta especie es muy próxima a otra de su mismo género, *Ziziphus Jujuba*. Es un arbusto espinoso y caducifolio, que pierde sus hojas en invierno. Se caracteriza por presentar sus ramas en zig- zag, y porque sus estípulas están transformadas en espinas, (una recta y la otra en forma de gancho). Alcanza una altura de entre 1 y 4 metros, y sus ramas se entrelazan formando un tejido impenetrable, que sirve de refugio a numerosas plantas y a la fauna silvestre. Tiene porte hemisférico. Sus ramas tienen un color grisáceo-blanquecino.

Las hojas son alternas, de forma aovado-elíptica, coriáceas y algo lustrosas. En su cara superior tienen tres nervios bien marcados y, su borde es festoneado. Las flores son minúsculas y hermafroditas, y se disponen en cimas axilares (Foto1). Son de color amarillo y tienen cinco sépalos, cinco pétalos y cinco estambres. El ovario está inmerso en el disco del receptáculo.

El fruto es una drupa globosa, de color marrón-rojizo o achocolatado, y de tamaño igual o mayor que un guisante. Es comestible, pero tiene poca carne y ésta no es muy sabrosa. Suele florecer entre junio y julio, y el fruto madura a finales de verano. Tiene gran capacidad de rebrote de cepa.

1.1.2 Adaptaciones

En cuanto a las adaptaciones de esta especie, el azufaifo es una especie xerófita adaptada a vivir en condiciones de aridez. Para soportar estas condiciones presenta una serie de adaptaciones:

- Reducción de la superficie transpirante; esto lo consigue presentando hojas pequeñas y con cierto carácter esclerófilo (por el engrosamiento de las paredes epidérmicas y revestimientos céreos).

- Desarrollo de un gran sistema radicular: permite a la planta extraer el agua de dos fuentes:

1. Nivel freático; mediante raíces centrales muy penetrantes que pueden llegar a los 60 metros de profundidad.

2. Subsuperficialmente, por escorrentía; mediante raíces laterales de la planta.

Otro tipo de adaptación que presenta esta especie es tener las estípulas transformadas en espinas, actuando así como defensa del ramoneo de los herbívoros.

La característica más asombrosa del azufaifo son sus poderosas raíces, que toman agua de lugares inalcanzables para otras plantas. Esta capacidad le permite desarrollar hojas en verano, cuando el sol irradia con más fuerza, obteniendo así, más energía. Las raíces son capaces de fijar dunas, creando un suelo fijo. El entramado de hojas endurecidas hace que el vapor de agua se condense y quede a los pies de la planta. En definitiva, este enriquecimiento en nutrientes del suelo, así como la

retención de agua, hacen que, cerca y bajo el azufaifo, encuentren cobijo otras especies, tanto de animales como de vegetales (Fuente: www.carm.es)



Foto 1. Aspecto del porte y del conjunto de la planta, con detalle (al lado izquierdo) de la inserción de las hojas en los tallos y del capítulo floral (abajo), así como las ramas en forma de zig-zag.

1.1.3 Hábitat y Ecología

Con respecto al hábitat y a la ecología de la especie, se circunscribe al piso termomediterráneo con ombrotipo semiárido, habitando en cauces arenosos o pedregosos de ramblas, en márgenes de cultivos y en terrenos nitrificados de cultivos abandonados.

Se trata de un iberoafricanismo con distribución circunmediterránea, presente también en el Sáhara y en la Península Arábiga. En la parte occidental de Europa presenta poblaciones en Sicilia y en el Sureste de la Península Ibérica (Murcia y Almería).

Dentro de la Región de Murcia, se distribuye por la mitad meridional, desde las sierras costeras de Cartagena a la Sierra de Enmedio (Águilas), Campo de Cartagena, Fuente Álamo y Valle del Guadalentín, alcanzando, incluso, la Sierra de Carrascoy y la Sierra del Puerto (Murcia), como límite más septentrional.

Aparece ligada a suelos ricos en cal, desde calizas en costra hasta margas más o menos salinas.

Suele aparecer acompañando a especies como *Anagyris foetida*, *Artemisia barrelieri*, *Asparagus albus*, *Ballota hirsuta*, *Retama sphaerocarpa*, *Rhamnus oleoides subsp angustifolia*, *Ruta montana*,...

Los matorrales en los que aparece esta especie (Código 5220 de los Hábitat del Anexo I de la Directiva Hábitats) se incluyen dentro de la alianza fitosociológica, *Periplocion angustifoliae*, concretamente en las asociaciones *Ziziphetum loti*, *Zizipho-Maytenetum europaei* y *Mayteno- Periplocetum*. El hábitat 5220 está catalogado como muy raro según la Directiva Hábitat. Constituye formaciones arbustivas abiertas, que son la etapa clímax en las series de vegetación edafoxero-psammófilas.

Es una especie de marcado carácter freatófilo, pues la disponibilidad de agua en el nivel freático condiciona, en gran medida, su desarrollo.

Una característica muy importante de esta especie, dentro de la dinámica de las comunidades vegetales, es que presenta una interacción de facilitación, de signo positivo, con otras especies vegetales. Esto significa que *Ziziphus lotus* crea lo que se conoce como “Islas de Recursos” (Foto 2 y 3), que tienen un microclima más benigno; retienen mucho volumen de material suelto y enriquecen el suelo de nutrientes; ello favorece la aparición, supervivencia y éxito reproductivo de otras especies vegetales, bajo el cobijo producido por los arbustos de *Ziziphus lotus*. El efecto de *Ziziphus lotus* sobre otros arbustos vecinos es positivo a largo plazo, aunque depende de las variaciones ambientales. La agregación de especies vegetales en estas “Islas de Recursos” es una medida indirecta de la facilitación. Las comunidades bajo estrés ambiental tienden a estar estructuradas por interacciones positivas, y la aparición de una especie dominante benefactora, en una mancha de vegetación, incrementa la diversidad y productividad de especies, en comparación con los espacios entre arbustos circundantes. Estas interacciones de signo positivo entre plantas se intensifican cuando las condiciones ambientales se hacen más severas (Fuente: Servicio de Ordenación y Gestión de los Recursos Naturales. Dirección General del medio natural).



Foto 2. Formación típica del azufaifo en la zona de Murcia y Almería

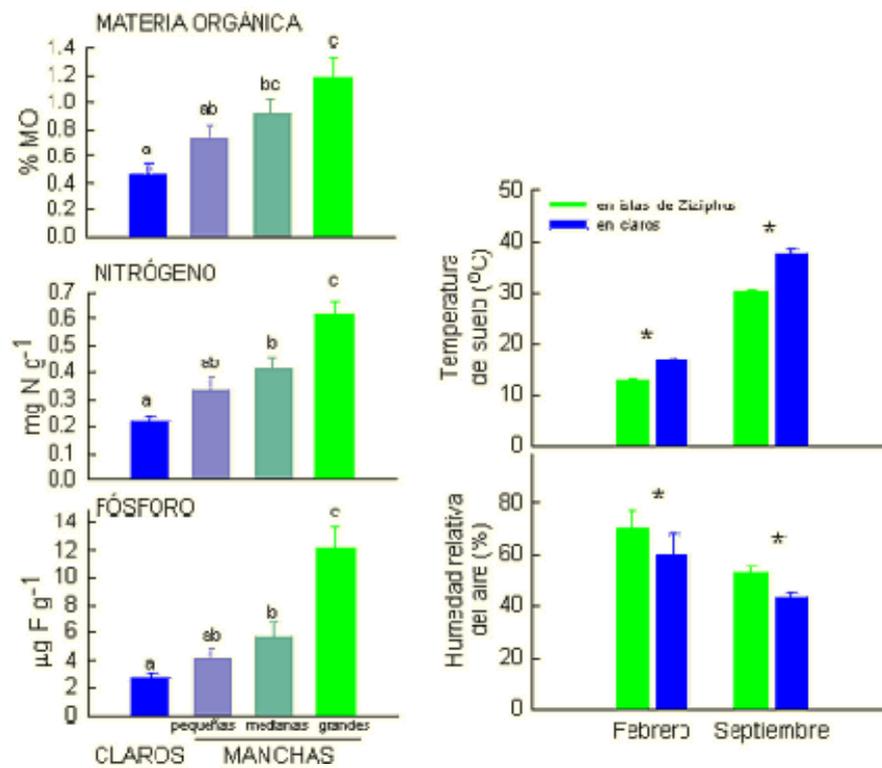
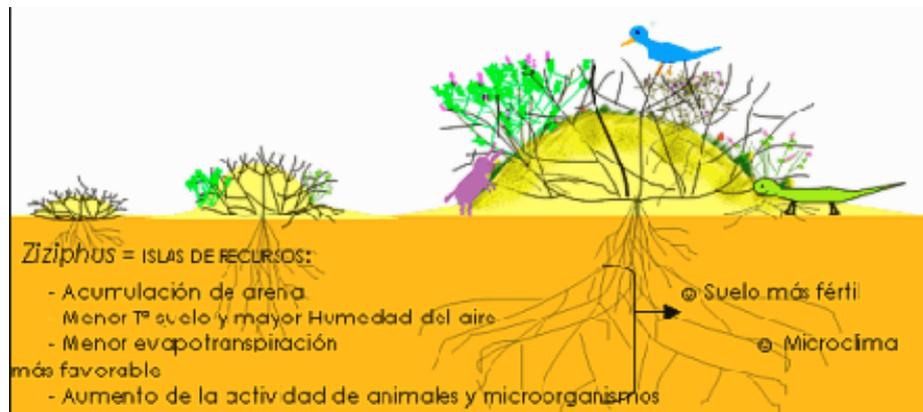


Foto 3. Cambios producidos por *Ziziphus lotus* en su entorno y que generan “islas de recursos” en las comunidades de azufaiños de Torregarcía, en el P.N. de Cabo de Gata-Níjar, Almería. Fuente: www.aeet.org/ecosistemas/032/articulo4.htm. Autora: Reyes Tirado

Fernández

1.1.4 Conservación

Con respecto al estatus de protección, según el Decreto nº 50/2003, publicado en el BORM nº 131 (por el que se crea el Catálogo Regional de Flora Silvestre Protegida de la Región de Murcia y se dictan normas para el aprovechamiento de diversas especies forestales), *Ziziphus lotus* es considerado como vulnerable. Ello implica la necesidad de redactar un Plan de Conservación para esta especie; por lo que hay que trabajar, en este sentido, de cara a preservar esta especie tan peculiar.

El principal riesgo que afecta a la especie es la agricultura. La puesta en cultivo de zonas propicias para la especie ha hecho que ésta quede relegada, en muchos lugares, a los linderos de separación entre fincas.

Con el fin de elaborar una estrategia de conservación de esta especie, sería interesante tener en cuenta varios aspectos a realizar:

Fomentar la creación de microrreservas de flora en la Región de Murcia, incluyendo, en ellas, especies catalogadas; al menos las que representen hábitats del Anexo I de la Directiva Hábitats, como es el caso del *Ziziphus lotus*. El fin perseguido con la creación de microrreservas es obtener una representación de la biodiversidad vegetal con fines múltiples (conservación, educación...).

Programas de conservación ex situ: pueden realizarse dos tipos de actuaciones de conservación ex situ:

- Acciones a largo plazo, que pretenden conservar el germoplasma. Para ello, se recurre a crear bancos de semillas o a la críoconservación. Estas técnicas permiten disponer de semillas viables durante un largo periodo de tiempo.
- Acciones a medio y a corto plazo, que tratan de obtener cultivos de la planta en cuestión en pequeñas cantidades (de cara a futuras reintroducciones o reforzamientos poblacionales). Esto, a su vez, se puede conseguir mediante diferentes procesos:

- Bancos de germoplasma a alta temperatura.
- Producción de plantas a partir de semillas o por procedimientos vegetativos. Sería interesante producir plantas de esta especie (así como del resto de especies catalogadas) en los viveros pertenecientes a la Dirección General del Medio Natural, utilizando semillas recolectadas en el área de distribución de esta especie en la Región de Murcia.
- Técnicas in vitro: Se usan dichas técnicas para especies con bajos efectivos poblacionales o con baja tasa de germinación (como ocurre con el *Ziziphus lotus*). El riesgo de estas técnicas es que se obtienen clones y, al transplantarlos al campo, puede que disminuya la diversidad genética intraespecífica de la población.

Programas de conservación in situ: Hay varios tipos de actuaciones a realizar:

- Proceder a la restauración de hábitats de esta especie que, actualmente, se encuentran en avanzado estado de degradación; utilizando plántulas de vivero de dos savias y usando tubos protectores para esas plántulas.
- Realizar plantaciones puntuales en ramblas ubicadas dentro del área de distribución de la especie.
- Reforzar poblaciones frágiles.
- Favorecer el pastoreo en las zonas de distribución de la especie, ya que el ganado es la principal fuente de dispersión de sus frutos. Otros animales, como conejos y micromamíferos, usan los frutos como fuente energética y no contribuyen a la dispersión de la especie.
- Establecer medidas agroambientales para fomentar la plantación del *Ziziphus lotus* como seto vivo en los linderos de las fincas agrícolas. Estos setos vivos

sirven de corredor ecológico para la fauna silvestre y, permiten la dispersión del *Ziziphus lotus*.

Por tanto, parece interesante conocer los medios de producción y sus características, así como las condiciones que afectan al desarrollo de las especies silvestres con la finalidad de cumplir los objetivos en el párrafo anterior. En la producción comercial en vivero es necesario disponer de los conocimientos agronómicos y fisiológicos necesarios y de la tecnología adecuada que permita su propagación en óptimas condiciones, con resultados aceptables y respeto máximo al medio ambiente, todo destinado a la reforestación de esta especie. Resulta fundamental conocer a fondo las características reproductivas y los principales factores influyentes en la misma.

1.2 ESTUDIO DE LA GERMINACIÓN

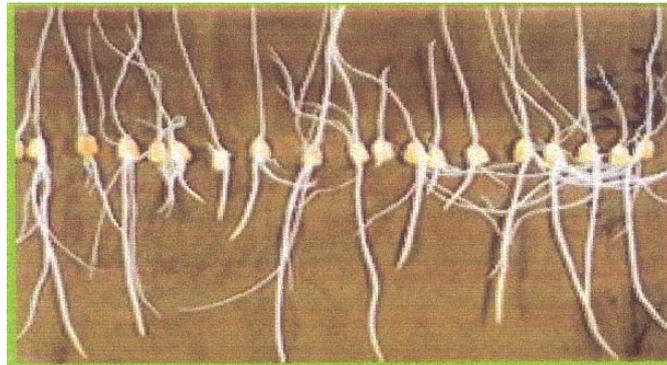
1.2.1 Concepto de germinación

La germinación es el proceso que se inicia con la toma de agua por parte de la semilla seca (imbibición) y termina cuando una parte de ésta (eje embrionario en dicotiledóneas o radícula en monocotiledóneas y gimnospermas) se extiende y atraviesa (emergencia) las estructuras que la rodean. En el caso de semillas endospermicas, la resistencia que oponen los tejidos envolventes del embrión (testa y endospermo) es tan importante que para que se produzca la emergencia se requiere la degradación enzimática de ciertas zonas envolventes (Azcon-Bieto y Talón, 2000). En la foto 4, podemos observar la forma y estructura de las semillas de *Ziziphus lotus*.



Foto 4. Semillas de *Ziziphus Lotus*.

Se toma como regla práctica que una semilla ha germinado cuando su radícula atraviesa la cubierta seminal y alcanza como mínimo 1 mm de longitud. En embriones desnudos coincide con el inicio de la elongación de la radícula.



Diferencia en la velocidad de germinación en plántulas de maíz.

Cualquiera que sea la definición de germinación que adoptemos, el proceso siempre es el mismo y para que se produzca es imprescindible que se den las siguientes condiciones básicas:

- La semilla debe ser viable; esto es, el embrión debe estar vivo y ser capaz de germinar.

- La semilla no debe estar en letargo ni el embrión quiescente. No deben existir barreras fisiológicas o físicas que induzcan letargo, ni barreras químicas para la germinación.

- La semilla debe estar expuesta a las condiciones ambientales apropiadas; disponibilidad de agua, temperatura adecuada, provisión de oxígeno y en ocasiones luz. Debido a las complejas interacciones entre el ambiente y condiciones específicas de letargo, dichas exigencias pueden cambiar con el tiempo y los métodos de manejo de las semillas también. Así, el segundo requisito, evitar el letargo, puede, a veces, satisfacerse proporcionando las condiciones ambientales apropiadas.

1.2.2 Fases de la germinación

En la germinación se pueden diferenciar las siguientes fases:

1ª.- Fase de hidratación o imbibición: corresponde a una intensa absorción de agua por los diferentes tejidos que forman la semilla y generalmente va acompañada de un aumento proporcional en la actividad respiratoria.

2ª.- Fase de germinación: es el verdadero proceso de germinación, en ella se estabiliza la absorción de agua y la actividad respiratoria, y se producen importantes transformaciones metabólicas, en donde las complejas sustancias de reserva se transforman en otras más sencillas, asequibles al embrión.

3ª.- Fase de crecimiento: es la última de la germinación y en ella se produce la iniciación de los cambios morfológicos visibles, es decir, la elongación de la radícula y se incrementa de nuevo la absorción de agua y el consumo de oxígeno.

1.2.3 Estructura de las semillas

Las semillas son unidades de diseminación y reproducción sexual de las plantas superiores, procedentes del desarrollo de los óvulos de sus flores. Están compuestas por de uno o varios embriones, reservas nutritivas y una o varias capas protectoras originadas a partir de los tegumentos del óvulo, del ovario, de los tejidos de la flor e, incluso, de la inflorescencia.

La estructura básica de las semillas de las angiospermas consta de cuatro componentes:

- El embrión, que procede del cigoto formado por la unión de la oosfera con una de las células generativas del tubo polínico; normalmente, el embrión es diploide y existe siempre en las semillas viables.

- El endospermo, que procede de la unión de los núcleos polares con la segunda célula generativa del tubo polínico. El endospermo es triploide o poliploide; puede formar la mayor parte de las reservas nutritivas, quedar reducido a una sola capa de células o ser reabsorbido.

- El perispermo, que procede del desarrollo de la nucela; es diploide y tiene la misma constitución genética que la planta madre. Generalmente el perispermo queda reducido o es reabsorbido poco después de iniciar su desarrollo pero en algunas especies es identificable y, en otras, forma la principal reserva de sustancias nutritivas.

- Las cubiertas, que constan de dos partes bien diferenciadas: una es la testa, que procede del desarrollo de los tegumentos del óvulo y que salvo casos raros existe siempre, siendo diploide y de origen materno; la otra parte está constituida por las cubiertas exteriores, que proceden de orígenes muy diversos y que faltan en las semillas que lo son en pleno sentido botánico.

1.2.4 Ecología de la germinación

El suelo es el entorno en el que habitualmente llegan las semillas al final de su dispersión. En el suelo sobreviven, perecen o germinan, sometidas a condiciones que dependen fuertemente del clima; las características de este entorno varían mucho según la zona geográfica.

La relativa abundancia de datos sobre la ecología de las semillas en los suelos de las regiones húmedas y templadas puede llevar, en ocasiones, a tener una visión que no es totalmente generalizable a otras regiones climáticas, como son las mediterráneas; y esto es de tener muy en cuenta.

Las semillas enterradas en el suelo o, más raramente, situadas sobre él, se encuentran sometidas a una serie de factores ambientales fluctuantes que

determinarán su germinación, su supervivencia en letargo o su muerte. Estos factores son de dos tipos: abióticos y bióticos. Los factores abióticos son humedad, temperatura, gases y luz, a los que puede añadirse la presencia de sustancias tóxicas o inhibidores de origen abiótico en la solución del suelo. Los factores bióticos son los microorganismos del suelo y las sustancias estimuladoras, tóxicas o inhibidoras de origen biológico cuya presencia suele responder a situaciones particulares.

1.2.4.1 Factores abióticos o físicos

Humedad

La primera fase de la germinación es la denominada fase de hidratación o imbibición. Para que esta fase se produzca la semilla a de estar en contacto físico con el agua en estado líquido. La magnitud de la fase de imbibición está determinada por tres factores: composición química de la semilla, permeabilidad de la envuelta seminal y disponibilidad de agua en el medio ambiente. La imbibición de la semilla es un proceso exclusivamente físico sin relación alguna con su viabilidad, pues sucede igual en semillas vivas y muertas. Las semillas deben lograr un cierto contenido de humedad mínimo específico antes de que ellas germinen. Así, la germinación puede ser inhibida si la cantidad de agua es demasiado baja, pero también puede que se inhiba la germinación si hay demasiada agua presente ya que dificulta la respiración del embrión.

Temperatura

La temperatura del suelo en la mayoría de los climas experimenta una variación cíclica a lo largo del día, más acusada en las capas superiores. Se sabe que las temperaturas alternantes ejercen un gran efecto sobre la ruptura del letargo ya que simulan las temperaturas que se dan en el hábitat natural.

La temperatura es un factor muy importante en la germinación, tanto es así que semillas diferentes en cuanto a variedad, origen geográfico, estado nutricional de la planta madre, grado de madurez, condiciones climáticas durante la formación, etc., tienen diferentes temperaturas de germinación.

Realmente las semillas no tienen una temperatura de germinación, sino un intervalo de temperaturas dentro del cual germinan; dentro de este intervalo está la temperatura óptima que es aquella en la que se presume que existirá el mayor porcentaje de germinación en el menor tiempo posible.

Es muy difícil definir esta temperatura óptima debido a la gran cantidad de factores que intervienen en cada especie.

Suele ser más favorable para la germinación utilizar un régimen de temperaturas alternas que constantes, ya que las primeras simulan las temperaturas que se dan en el hábitat natural.

Oxígeno

La atmósfera de la capa superficial del suelo es parecida a la situada sobre el terreno, quizás con más dióxido de carbono en suelos con mucha materia orgánica. En capas más profundas y bajo vegetación, la respiración de las raíces aumenta el contenido de carbono y reduce el oxígeno. Suele ser necesario un nivel de oxígeno del 19%, aunque lo normal es que la mayoría de las semillas germinen en una atmósfera con unos contenidos medios de oxígeno y de dióxido de carbono del 21% y 0.03% respectivamente.

Lo más importante para obtener un óptimo de germinación en referencia a este aspecto es proporcionar a las semillas un equilibrio adecuado entre humedad y aireación, esto suele ser difícil de conseguir incluso en las condiciones controladas de laboratorio.

Luz

La luz es un factor imprescindible para la germinación de las semillas; hay semillas activas de muchas especies que la necesitan para germinar, otras que germinan bajo una alternancia de luz-oscuridad y las que germinan en la oscuridad. Sin embargo, según Besnier Romero (1989), la luz no es imprescindible para la germinación de las semillas en reposo pero su efecto a través del fitocromo, puede romper el letargo o, contrariamente, producir letargo secundario. El mecanismo de acción de la luz se activa en la mayoría de las especies vegetales a través de este pigmento existente en las plantas llamado fitocromo.

Según Campos Garaulet *et al.* (1990), el papel de la luz en la germinación de las semillas no está muy claro, ya que con frecuencia las exigencias de luz varían y pueden ser reemplazadas por variaciones en la temperatura, aplicación de reguladores del crecimiento, etc.

Salinidad y otros factores abióticos

Aunque la salinidad de la solución del suelo crea un potencial osmótico que dificulta la entrada de agua en las semillas, se cree que la mayor parte de los efectos en la germinación se deben a la entrada de iones tóxicos, como el sodio.

1.2.4.2 Factores bióticos

Los factores bióticos son los microorganismos del suelo y las sustancias estimuladoras, tóxicas o inhibitoras de origen biológico.

Los factores bióticos que influyen o pueden influir en la germinación de las semillas del banco del suelo son sustancias químicas estimuladoras o inhibitoras producidas por microorganismos del suelo, por los restos de plantas en descomposición, por raíces de plantas vivas y por animales.

1.2.5 Concepto de latencia o letargo

Inactividad, dormición, latencia y letargo son sinónimos; todos ellos se pueden definir como el estado por el cual una semilla viable no germina aunque se la coloque en condiciones normalmente adecuadas, es decir, aunque se incube con una temperatura, humedad y concentración de oxígeno idóneas. (Pérez García *et al.* 1993).

Algo muy similar dice Fenner (1995): la inactividad o dormición de las semillas es un mecanismo de retraso que impide la germinación bajo condiciones que son apropiadas para su establecimiento.

Según Besnier Romero (1989), se denomina letargo al fenómeno por el cuál una semilla viable no germina cuando se coloca en un sustrato húmedo, aireado y a temperatura suficiente para sostener los procesos metabólicos que conducen a la germinación; salvo casos extremos, esta temperatura oscila entre los 20 y los 25°C.

Por lo tanto, una vez la semilla se desprende de la planta madre y con las condiciones adecuadas no siempre se produce la germinación. La respuesta a esto puede ser porque ya están en proceso avanzado de deterioración, que culmina con la muerte del embrión o, entonces, están durmientes. Las primeras absorben agua pero no completan las actividades metabólicas esenciales para el crecimiento del eje embrionario por lo que no originan una planta completa con raíz y parte aérea.

1.2.5.1 Tipos de letargo

La clasificación que hace Besnier Romero (1989), coincide con la que hacen muchos otros autores, y consiste en distinguir entre:

- 1- Letargo extraembrional
- 2- Letargo embrional

1- Letargo extraembrional

Los tejidos que encierran al embrión ejercen una restricción que este no puede superar; solo se manifiesta en semillas intactas y si se aísla el embrión germina con normalidad.

Este tipo de letargo se debe a dos causas principales: existencia de barreras físicas y presencia de inhibidores químicos en las cubiertas. Las barreras físicas impiden la imbibición del agua, el aporte de oxígeno, la expansión del embrión y el escape de inhibidores contenidos en éste; también filtran la luz que llega al embrión.

1.1 - Impermeabilidad al agua

La impermeabilidad de las cubiertas seminales al agua impide que se realice la primera fase de la germinación, llamada fase de hidratación o imbibición; siendo esta una de las principales causas de dormición.

La presencia de cubiertas impermeables al agua es una constante en determinadas especies, incluso es determinadas familias como las papilionáceas, gramíneas, malváceas, cannáceas, geraniáceas, solanáceas, convolvuláceas, leguminosas, etc.

Este tipo de dormición suele eliminarse con la escarificación de las semillas.

1.2 - Impermeabilidad de los gases

El intercambio gaseoso del embrión con el exterior se ve, a veces, dificultado por las diferentes capas de tejido que lo rodean; se produce bien porque se ve impedida la entrada de oxígeno, o bien porque se ve dificultada la salida de dióxido de carbono; cualquiera de las dos circunstancias es una interferencia con la respiración, dando como resultado la no germinación de la semilla. Posteriormente se hizo una distinción entre aquellos casos en que existía una verdadera impermeabilidad física al oxígeno y aquellos otros en que las bajas cantidades de

oxígeno que llegaban al embrión se debían al consumo que tenía lugar en las cubiertas.

Sin embargo, en la mayoría de casos se ha llegado a la conclusión de que, pese al bajo nivel de oxígeno que llega al embrión, este nivel es suficiente para sus necesidades respiratorias en las primeras fases de la germinación, por lo que deben buscarse otras explicaciones.

De cualquier modo, los ensayos parecen indicar que es la impermeabilidad al oxígeno y no al dióxido de carbono lo que produce este tipo de dormición.

Dos son los motivos que suelen producir un bajo coeficiente de difusión de oxígeno: presencia de mucílago en la cubierta o alrededor de ella y consumo de oxígeno por la propia cubierta, reduciéndose por ello la cantidad que pasa a través de ella.

1.3 - Presencia de inhibidores en la cubierta

Como ya se ha dicho anteriormente, las cubiertas pueden contener sustancias que inhiben la germinación o impedir que los inhibidores presentes en el embrión desaparezcan por difusión al exterior.

El inhibidor más estudiado es el ácido abscísico, pero aún así ni se puede afirmar tajantemente que cause dormición su presencia exógena o endógena.

1.4 - Impedimentos para la salida de inhibidores.

Los inhibidores también aparecen en los tejidos internos de algunas semillas, además de en sus cubiertas; cuando esto sucede y las cubiertas impiden su salida al exterior, la dormición se mantiene debido a la alta concentración de inhibidores endógenos.

1.5 - Restricciones mecánicas.

Estas restricciones mecánicas pueden eliminarse fácilmente mediante incisiones en la cubierta, punciones o eliminándolas parcialmente.

2 - Letargo embrional

Existen dos tipos muy distintos de letargo embrional:

- Inmadurez morfológica del embrión; éste no ha completado su crecimiento y desarrollo en la época en que la semilla se dispersa o se recoge.
- Inhibición fisiológica; con un embrión totalmente desarrollado, la semilla se hidrata cuando se encuentra en sustrato húmedo, pero no germina a causa de desequilibrios fisiológicos o bioquímicos. Este es el letargo embrional en sentido estricto.

De los inhibidores conocidos el más generalizado es el ácido abscísico (ABA), otros son la cumarina y diversos compuestos fenólicos.

Los posibles tratamientos antes mencionados que eliminan o contrarrestan la actividad de los inhibidores y por lo tanto eliminan el estado de dormición son: temperatura, estratificación, aplicación exógena de ácido giberélico, etc.

1.2.5.2 Otros tipos de letargo

Salvo en el caso del letargo embrional antes descrito y el producido por impermeabilidad de las cubiertas al agua, es raro que aparezca letargo que esté exclusivamente provocado por las cubiertas o por el embrión. El letargo de tipo mixto es patente, sobre todo, en casos en que se ha detectado un efecto de las

cubiertas debido a la impermeabilidad de los gases, presencia de inhibidores, posible resistencia mecánica a la salida de la radícula, sensibilidad a la luz, etcétera.

Hay casos en que el efecto del embrión y las cubiertas son sucesivos: tras la maduración existe letargo embrional por inhibición fisiológica y cuando éste ha desaparecido, se presenta un letargo a más largo plazo provocado por las cubiertas.

Otro tipo de letargo mixto es el que combina cierto grado de inmadurez morfológica del embrión con su inhibición fisiológica; estos tipos se presentan en especies aisladas y los mecanismos implicados son difíciles de elucidar, pero parece que la mayoría de los ejemplos conocidos de inmadurez morfológica del embrión son de tipo mixto. Los embriones están inicialmente inmaduros y cuando completan su desarrollo entran en letargo fisiológico o bien aparece un letargo provocado por las cubiertas. Ello puede comprobarse observando directamente el crecimiento del embrión, en estratificación cálida en especies tropicales y, luego, la aparición de un letargo que requiere estratificación en frío para su ruptura.

Letargo secundario

El letargo secundario aparece en semillas en reposo como consecuencia y en respuesta a condiciones ambientales especiales. Desde el punto de vista adaptativo, tales condiciones pueden ser desfavorables a la germinación o bien ser indicativas de una situación futura desfavorable para el crecimiento subsiguiente de las plántulas.

Este letargo secundario ofrece la posibilidad de experimentar amplia y fácilmente los efectos de factores ambientales y de sustancias químicas, lo que es más fácil de realizar para intentar dilucidar las causas de la aparición de letargo primario, cuando las semillas en maduración aún no se han separado de la planta madre.

Una relación de factores que han provocado letargo secundario en diversas especies, es la siguiente:

- Oscuridad
- Exceso de luz blanca y rojo-lejana (750 nm)
- Falta de oxígeno o exceso de dióxido de carbono
- Escasez o exceso de agua
- Inhibidores químicos: ácido abscísico, cumarina, etc.
- Desección de la semilla hidratada

1.2.5.3 Factores del letargo

Los factores que impiden la ruptura del letargo suelen coincidir con los que se acaban de mencionar y que provocan la aparición de letargo secundario. Las causas del letargo son la presencia de estados o concentraciones desfavorables de: temperaturas, humedad, oxígeno, luz, inhibidores químicos, sustancias hormonales y compuestos oxidantes.

1.2.5.4 Factores generales para la germinación

A excepción de las semillas duras, las semillas en letargo están hidratadas o pasan por fases alternantes de desecación e hidratación. La falta de humedad durante la maduración parece provocar letargo en algunas ocasiones. También hay casos aislados de inducción de letargo secundario cuando la semilla se deseca después de estar hidratada o cuando la cantidad de agua que absorbe la semilla es baja.

Temperaturas

Durante la maduración, las temperaturas extremas pueden provocar letargo. Por ejemplo, en las gramíneas la maduración a baja temperatura puede provocar la

aparición de letargo. En otras especies, el letargo es inducido por las altas temperaturas durante la maduración.

Una vez maduras las semillas, la acción de temperaturas extremas puede provocar también letargo secundario. También está ampliamente demostrado que las temperaturas alternantes que simulan las oscilaciones naturales en el ciclo día/noche ayudan a superar las situaciones de letargo y sólo secundariamente favorecen la germinación.

Igualmente sucede cuando las semillas hidratadas se someten a bajas temperaturas durante períodos de tiempo más o menos largos; ésta técnica se denomina estratificación o, más apropiadamente, "estratificación en frío". Con ello se simulan condiciones naturales a las que se ven sometidas las semillas hidratadas situadas en el suelo, durante el invierno u otras épocas; la estratificación en frío es necesaria para romper el letargo de las semillas de numerosas plantas leñosas de clima templado.

Más raramente puede romperse el letargo por la acción de temperaturas altas de breve duración y, en ocasiones, es necesario alternar la estratificación cálida con la estratificación en frío.

Efectos del oxígeno

Existen casos aislados en los que la anaerobiosis puede inducir letargo secundario en suelos arcillosos mal aireados; pero sin embargo esto no es frecuente.

Efectos de la luz

Numerosas semillas no germinan cuando se colocan en condiciones favorables, pero en la oscuridad. Otras permanecen aletargadas bajo una iluminación continua. Finalmente, hay semillas que germinan tanto a la luz como en la oscuridad.

1.2.5.5 Inhibidores y estimuladores de la germinación. Mecanismos para romper la latencia.

Ya se ha mencionado la posible acción de compuestos químicos inhibidores de la germinación, situados en las cubiertas o en el embrión, como causa del letargo de las semillas, bien sea a través del bloqueo de reacciones bioquímicas, bien sea consumiendo oxígeno.

Con el uso de inhibidores exógenos (situados fuera de las semillas), la semilla puesta a germinar en su presencia permanece aletargada y no germina hasta que el inhibidor se elimina por lavado o la semilla se somete a un tratamiento, como la aplicación exterior de alguna hormona como la giberelina, que contrarresta la acción del inhibidor. Sin embargo, el papel de los inhibidores endógenos no está todavía claro, los cuales son sustancias producidas de modo natural por las semillas en maduración y que, localizadas en las cubiertas o en el embrión, provocan el letargo.

De las sustancias exógenas que rompen el letargo destacan tres reguladores del crecimiento: giberelinas, citoquininas y el etileno. Todas ellas se encuentran en las semillas de modo natural, en formas endógenas, variando su contenido durante las fases de formación de las semillas, letargo y germinación.

El período de duración de la dormancia es muy variable entre especies. Semillas de algunas hortalizas y gramíneas forrajeras tienen un período corto de dormancia, por lo que el tiempo entre cosecha y siembra es suficiente para superarla, sin necesidad de tratamientos para romperla, bastando el almacenamiento.

La inmersión de semillas de gramíneas forrajeras en ácido sulfúrico concentrado es eficiente para reducir ese letargo.

En especies como leguminosas arbóreas y fruteras de clima templado, la dormancia puede ser más acentuada, siendo necesario utilizar tratamientos específicos antes de sembrar.

La superación de la dormancia fisiológica involucra modificaciones hormonales en el embrión, o sea, tanto la reducción de la concentración de inhibidores como la síntesis de fitohormonas promotoras de la germinación. Así, métodos que impidan la acción de los primeros o que aumenten la concentración de los promotores son los más recomendados. La imbibición directa de las semillas en solución de ácido giberélico puede ser eficaz.

Para especies de clima templado, un período de exposición a bajas temperaturas en sustrato húmedo es suficiente para promover la alteración necesaria en el balance hormonal, conociéndose como estratificación en frío, ya que las semillas son colocadas en el sustrato humedecido.

El calor seco o temperaturas relativamente altas (superiores a 35°C) también ayudan a superar la dormancia.

La dormancia puede ser causada además por compuestos químicos inhibidores presentes en diferentes estructuras de la semilla. Como la mayoría de los compuestos son solubles al agua, el agua de la lluvia o del deshielo de la nieve lixivian tales compuestos.

Los tejidos que circundan el embrión o los propios del embrión pueden restringir la entrada de O₂ y la salida de CO₂, interfiriendo en la respiración de la semilla y boqueando el crecimiento del embrión. Para superar el letargo en laboratorio, se utiliza tratamiento de escarificación química (H₂SO₄) para destruir la “cáscara” que es la responsable de la retención del O₂.

En semillas con dormancia morfológica, es necesario un período de tiempo hasta el completo desarrollo del embrión. La estratificación de las semillas es el método más adecuado para promover el desarrollo del embrión. En especies de la familia *Rosaceae*, además de dormancia morfológica presentan también dormancia fisiológica; por lo que en estos casos se recomienda también la estratificación en frío (30 a 90) días para promover la maduración del embrión modificando el balance hormonal del mismo.

Existen antecedentes de que el impedimento más frecuente de la germinación para especies leñosas de matorral es la latencia física provocada por una testa dura e impermeable (Figuroa *et al.*, 1996). La cubierta de la semilla llega a ser permeable naturalmente con el paso del tiempo, a través de escarificación natural, calor, fuego y la acción de ácidos que corroen la testa (Mohamed-Yasseen *et al.* 1994). La mayoría de estas especies pueden ser estimuladas a germinar con aplicación de ácidos sobre la testa de las semillas o una escarificación mecánica. La consecuencia inmediata de este mecanismo de latencia física sería el retraso de la germinación en las especies que dispersan sus semillas al inicio o durante la extensa sequía de verano.

Además, una latencia fisiológica de corta duración ha sido detectada para algunas especies leñosas de matorral, la que es liberada por la acción de bajas temperaturas, similares a las exhibidas durante el invierno. El enfriamiento de las semillas puede reducir la latencia a través de la movilización de las reservas de recursos (Bell, 1999). Este mecanismo retrasa la germinación y el establecimiento hasta finales del invierno e inicio de la primavera, respectivamente. Otro grupo de especies con latencia fisiológica presenta el síndrome opuesto. Ellas producen semillas que requieren un período de elevadas temperaturas para activar la germinación, similares a las exhibidas durante el verano. Este mecanismo permite que el establecimiento de las plántulas se inicie con el otoño. Las temperaturas cálidas pueden reducir la latencia a través de inactivar inhibidores de germinación o alterar la respiración celular (Bell, 1999).

En la naturaleza, cada mecanismo de dormancia es superado por diferentes agentes. Por ejemplo, los ácidos de la materia orgánica del suelo y los del tracto digestivo de los animales dispersores de semillas contribuyen para tornar el envoltorio de una semilla permeable al agua; el calor provocado por el fuego o por la abertura de un claro en la mata puede actuar en este sentido. El frío del invierno puede provocar alteraciones fisiológicas de las semillas, desbloqueando el crecimiento del embrión. Compuestos inhibidores son lavados por el agua de la lluvia o del deshielo.

En algunas especies el calor puede provocar un efecto similar a la acción del ácido sulfúrico sobre la testa (Muñoz & Fuentes, 1989). El calor puede provocar la abrasión de la cubierta de la semilla en las especies que presentan testa dura e impermeable o la destrucción de un inhibidor químico (Bell, 1999). Además, los componentes químicos del humo del fuego pueden también estimular la germinación (Bell, 1999), indicando la existencia de un sensor en las semillas que no ha sido aún identificado (Keeley & Fotheringham 1997, Van Staden *et al.* 2000).

El tejido carnoso que rodea la semilla puede inducir una latencia ejercida por inhibidores químicos de la germinación que podrían encontrarse en la pulpa (Cipollini & Levey 1997). Por lo tanto, animales que ingieren frutos y dispersan semillas pueden facilitar la germinación (Bell, 1999).

Todos los mecanismos de latencia interactúan entre ellos y con una variedad de factores ambientales, provocando una gran diversidad de respuestas de germinación adecuadas a las diferentes perturbaciones y estaciones de un clima mediterráneo. Concordamos con Vázquez-Yanes & Orozco-Segovia (1998) en que esto puede ser el origen del escaso banco de semillas persistente formado por semillas de cubierta delgada en diferentes áreas de clima de tipo mediterráneo.

Semillas en el suelo a una profundidad inadecuada, al germinar, sus reservas serían consumidas antes que la plántula alcance la superficie del suelo. Apenas cuando estén en situación donde predomine la radiación roja (sobre luz directa o localizada a 2-3 cm de profundidad en el suelo), van a germinar ya que tal radiación determina alteraciones en el metabolismo del embrión conduciéndolo para el desarrollo.

1.2.5.6 Causas del letargo

Existen dos hipótesis, según Besnier Romero :

La primera supone la existencia de un equilibrio entre sustancias químicas estimuladoras e inhibidoras, fundamentalmente entre giberelinas y citoquininas por un lado, y ácido abscísico por otro. Parece que las giberelinas son las sustancias estimuladoras más importantes y que su acción es modulada por un equilibrio entre citoquininas y ácido abscísico.

Esta hipótesis no explica todos los casos pues no siempre se comprueba la disminución del ácido abscísico endógeno o el aumento de las giberelinas endógenas al aplicar tratamientos que favorecen la germinación, pero, realmente, tampoco se conocen los momentos concretos de la acción de estas sustancias, ni las concentraciones que rompen el equilibrio en uno u otro sentido, ni la sensibilidad de las semillas de las diferentes especies a la acción de estas sustancias a determinadas concentraciones. Tampoco explica la acción de los inhibidores de la respiración, por lo que ha dado lugar a una segunda hipótesis, la de la activación de los fenómenos respiratorios del ciclo del fosfato de pentosa, pero que no explica la razón de la finalización del letargo cuando se activan dichos fenómenos o se inhibe el ciclo de Krebs. Además, deja sin aclarar el papel de los factores físicos y de las giberelinas.

1.2.6 Significado ecológico de la latencia y la germinación

A continuación trataremos de resumir la diversa información existente sobre el significado ecológico de la latencia y de la germinación, siguiendo principalmente el trabajo de Rey *et al*, 2003.

Como ya hemos dicho, cuando una semilla abandona la planta parental está en disposición de originar un nuevo individuo, siempre y cuando se encuentre en las condiciones fisiológicas adecuadas para hacerlo y cuando las condiciones del medio

favorezcan el inicio de la germinación. Ahora bien, las semillas recién diseminadas es probable que ocupen todo un rango de lugares, que va desde los propicios hasta los totalmente inadecuados para la germinación. La latencia, en cualquiera de las formas que se presente, supone un mecanismo de retardo de la germinación, evolutivamente seleccionado porque puede eludir condiciones desfavorables para el establecimiento de una nueva plántula; de esta forma la latencia llega a ser unpreciado mecanismo de la selección natural. En función de las especies, así como de las condiciones ambientales dominantes, la latencia puede prolongarse desde tan sólo unos días, hasta muchas décadas, lo que resulta en todo un rango de longevidades seminales (Tabla 1).

Tabla 1. Ejemplos de longevidad seminal en especies citadas en la bibliografía (Kivilaan & Badurski, 1981; Shen-Miller *et al.* 1995; Catalán Bachiller, 1991). Tiempo en años.

Especie	Longevidad (años)
<i>Anagallis foemina</i>	60
<i>Antyllis vulneraria</i>	90
<i>Cassia bicapsularis</i>	87
<i>Cytisus scoparius</i>	70
<i>Ipomoea sp.</i>	43
<i>Lavatera olbia</i>	64
<i>Lens esculenta</i>	65
<i>Lotus uliginosus</i>	81
<i>Malva rotundifolia</i>	100
<i>Nelumbo nucifera</i>	1350
<i>Stachys nepetifolia</i>	77
<i>Trifolium arvense</i>	68
<i>Verbascum blattaria</i>	100

Fuente: Rey *et al.*, 2003.

La capacidad de las semillas para permanecer latentes durante prolongados períodos de tiempo está asociado al tipo de hábitat que ocupan las plantas madre. La proporción de semillas con latencia es muy superior en especies procedentes de hábitats fuertemente imprescindibles y/o sometidos a perturbaciones recurrentes, como pueden ser los desiertos, manglares y/o zonas costeras, espacios incendiados o sometidos a actividad antropogénica intensa (Ungar 1996; Hautala *et al.* 2001; Pujol *et al.* 2001).

El clima contribuye igualmente a la selección y desarrollo de especies con semillas latentes, especialmente bajo condiciones áridas y semiáridas donde la precipitación es irregular tanto en intensidad como en distribución. La latencia bajo estas circunstancias puede interpretarse como una cualidad adaptativa capaz de evitar que las semillas respondan con una germinación positiva ante una precipitación ocasional, fuera de la época en que es más probable que se garanticen las condiciones adecuadas para el subsiguiente desarrollo de una nueva planta.

La germinación precoz ante cualquier estímulo hídrico, insuficiente para garantizar las condiciones óptimas de humedad, conduciría a una semilla no latente a perecer casi inmediatamente tras haber germinado. Numerosos autores (Freas & Kempt, 1983; Philippi, 1993) han puesto de manifiesto la relación entre la latencia de semillas y la caída impredecible de precipitación en zonas áridas y desérticas. En estos ambientes se identifican dos estaciones, una adecuada para la germinación y establecimiento de semillas localizada a finales del verano, y otra inadecuada para el establecimiento de nuevas plántulas localizada al final del invierno. Las especies que germinan en la estación adecuada carecen en su mayoría de latencia, mientras que las que germinan al final del invierno presentan una intensa latencia que garantiza su persistencia.

Así pues, la latencia garantiza la persistencia de una especie en un determinado enclave, lo que se interpreta como dispersión en el tiempo (Debussche & Lepart 1994). Simultáneamente, la capacidad de permanecer en letargo favorece la dispersión de la especie en el espacio (Fuente: www.euita.upv.es).

1.3 ESTUDIO DE LA REPRODUCCIÓN POR ESQUEJES

1.3.1 Introducción

Ziziphus lotus L. presenta ciertas dificultades en la propagación por vía sexual por lo que dificulta su reproducción por esta vía, y por tanto nos dirige hacia la multiplicación vegetativa como medio alternativo de propagación

La reproducción asexual, es la reproducción empleando partes vegetativas de la planta original, esto es posible debido a que cada célula de la planta contiene la información genética necesaria para generar la planta entera, este fenómeno se conoce como totipotencia.

La mitosis es el método básico de crecimiento vegetativo, regeneración y cicatrización de heridas que hace posible poner en practicas las técnicas de propagación (estacas, injerto, acodado, separación y división). Estos métodos poseen gran relevancia debido a numerosos factores (Peñapareja, D. ; 2003. Reproducción por esquejes y crecimiento radical de *Helichrysum stoechas* (L.) Moench . Universidad Politécnica de Cartagena. 6-8.).

- Permiten la multiplicación a gran escala de una planta individual en tantas partes separadas como lo permita la cantidad del material materno.
- Posibilitan el mantenimiento de clones, en la clonación las características específicas de cualquier planta individual son perpetuadas por la propagación. Estas características específicas pueden ser de gran relevancia en cuanto que nos proporcionen una ventaja a la hora del proceso de adaptación de una determinada especie.
- Permiten la propagación de plantas sin semillas o plantas en las que la viabilidad de estas sea casi nula o presenten barreras en el momento de la germinación.

No obstante, hay que tener en cuenta la posibilidad de una cierta variabilidad y cambios conducentes a la deterioro entre las plantas de un clon, estos cambios se denominan mutaciones. Las mutaciones no siempre son degenerativas en sentido estricto, pudiendo producir individuos fuera de tipo que reduzcan el valor de un clon.

En la propagación por estacas y por estacas con yema foliar, solo es necesario que se forme un nuevo sistema de raíces adventicias, ya que existe un sistema caulinar en potencia, una yema. Esta capacidad para regenerar la estructura entera de la planta, es una propiedad que poseen esencialmente todas las células vegetales vivientes.

Esta capacidad depende de dos características fundamentales de las células vegetales:

- Totipotencia, cada célula vegetal viviente contiene la información genética necesaria para reconstruir todas las partes de la planta y sus funciones.
- Desdiferenciación, capacidad de las células maduras para volver a una condición meristemática y desarrollar un punto de crecimiento nuevo.

El desarrollo de un anillo de esclerénquima continuo entre el floema y la corteza, al exterior del punto de origen de las raíces adventicias y el cual a menudo esta asociado con la maduración, posiblemente constituyen una barrera anatómica para el enraizamiento.

Aunque en algunos casos una envoltura de tejido lignificado en los tallos puede actuar como una barrera mecánica para la emergencia de las raíces, existen tantas excepciones a ello que ciertamente no puede ser una causa primaria de la dificultad de enraizamiento. No obstante, los tratamientos con auxina y el enraizamiento bajo niebla ocasionan una expansión y proliferación considerable de las células de la corteza, el floema y el cambium, que resulta en rupturas de los anillos continuos del esclerénquima, pero aun así no se registra formación de iniciales de raíces en cultivares difíciles de enraizar de varias especies frutales.

La formación de raíces adventicias puede depender de ciertos factores inherentes no translocables, determinados por el genotipo de las células individuales del tejido. Sin embargo es probable que para establecer condiciones que favorezcan la iniciación de raíces existan interacciones entre ciertos factores fijos o no móviles situados dentro de las células, tal vez ciertas enzimas, y nutrientes fácilmente conducibles y factores endógenos del enraizamiento.

El fenómeno en el cual diferentes partes de la planta muestran variaciones de fase y cuyos meristemas perpetúan esas fases diferentes en su descendencia vegetativa, se denomina topófisis. La topófisis se manifiesta también en la persistencia de la forma de crecimiento en algunas plantas, después de la propagación vegetativa.

Ensayos realizados por Went (1983) demostraron que una estaca sin yema no forma raíz aunque se trate con una preparación rica en auxinas, esto demuestra la existencia de un factor diferente a la auxina, necesario para la formación de raíces y presumiblemente producido por la yema (ápice o yema lateral). Pasados tres o cuatro días desde la plantación de la estaca, se pueden remover las terminales y las yemas de la estaca sin que esto interfiera en la subsecuente formación de raíces.

Indudablemente los carbohidratos translocados de las hojas contribuyeron a la formación de raíces. Sin embargo, es probable que los fuertes efectos de las hojas para promover el enraizamiento se deban a otros factores más directos. Se sabe que las hojas y las yemas son grandes productoras de auxinas y los efectos se observan directamente debajo de ellas, indicando que hay implicado un transporte del ápice a la base.

Las estacas de ciertas plantas de enraizamiento difícil pueden no llegar a enraizar debido a la presencia de inhibidores del enraizamiento de ocurrencia natural. Esto se ve reflejado en numerosos estudios realizados tanto en especies leñosas como arbustivas.

Para la mayoría de las especies son beneficiosas las aplicaciones exógenas de auxinas, que inducen una rápida y prolífica producción de raíces adventicias. Incluso existen varias especies que tan solo pueden propagarse vegetativamente con la ayuda de auxinas.

El motivo de tratar estacas con sustancias reguladoras del crecimiento de tipo auxinas es aumentar el porcentaje de estacas que forman raíces, acelerar la iniciación de ellas, aumentar el número y la calidad de las raíces producidas por estaca y aumentar la uniformidad del enraizamiento. Es posible que en plantas que enraízan con facilidad no se justifiquen los gastos y esfuerzos adicionales del tratamiento.

Las sustancias químicas que se han encontrado como mas efectivas para estimular la producción de raíces adventicias en estacas son el ácido indolbutírico (IBA) y el ácido naftalenacético (NAA). El IBA es probablemente el mejor material para uso general debido a que no es tóxico para las plantas en una amplia gama de concentraciones y es efectivo para estimular el enraizamiento en un gran numero de especies de plantas.

Es sabido que el enraizamiento puede ser alterado mediante la aplicación de reguladores de crecimiento. El ácido indolbutírico (AIB) es un compuesto hormonal muy común, utilizado para el enraizamiento de esquejes, que ha demostrado su efecto promotor sobre la rizogénesis de esquejes de numerosas especies (Jarvis, 1968; Piccioni *et al.*, 1996; Lee y Suh, 1997; Khabou y Drira, 2000; Klein *et al.*, 2000).

También cabe mencionar otras sustancias que han dado buenos resultados, como son el ácido indolacético (AIA) y el 2,4,5-T (Iveta, 1975). Si bien, el AIA es muy móvil y tiende a inducir raíces a lo largo de la estaca, y las auxinas fenoxi (2,4D; 2,4,5-T) pueden producir raíces anormales. En bioensayos ha dado buen resultado el ácido 2-hidroxifenilacetico (Vázquez *and Orozco*, 1998).

El estudio del sistema radical es de gran importancia debido a que se trata de un órgano con importantes y variadas funciones, tales como: absorción de nutrientes y agua del suelo, así como el transporte de los mismos desde donde fueron absorbidos

hasta los tallos; son el lugar de síntesis de varias hormonas vegetales y reguladores del crecimiento; pueden actuar como órganos de reserva; y anclan la planta en el suelo.

A pesar de que las distintas especies vegetales tienen unas características determinadas genéticamente de crecimiento radical, estas pueden ser substancialmente modificadas por el medio ambiente en que las raíces se desarrollen (Scott, 1977; Bathke *et al.*, 1992; Smucker y Aiken, 1992); así, la velocidad y forma de crecimiento radicular en el suelo varían con las propiedades físicas, químicas y biológicas, el potencial genético y el clima.

En cuanto a las propiedades físicas del suelo, un factor clave es el grado de aireación de suelo a diferentes profundidades (Westwood, 1982; Brown y Scott, 1984; Drew, 1988; Giulivo, 1990; Meyer y Barrs, 1991; Zobel, 1991). Entre las otras propiedades físicas del suelo; si bien están todas frecuentemente relacionadas, se han realizado diversos estudios específicos sobre la influencia desarrollo radicular de la textura (Dwyer *et al.* 1988), el tamaño de los agregados (Logsdon *et al.* 1987), la densidad aparente y la macroporosidad (Hughes y Wilde, 1988) y la profundidad (Brown y Scott, 1984).

Otro factor a tener en cuenta es la distribución de las raíces en el perfil del suelo, habitualmente las raíces no suelen ocupar más del 5% del volumen del suelo, incluso en los horizontes superficiales, donde son más abundantes. Para la mayoría de cultivos, el volumen que ocupan decrece rápidamente al aumentar la profundidad y frecuentemente no es más de una centésima a una milésima por ciento a partir de 50-60 cm (Greenwood *et al.*, 1982). De esto se deduce que solo una pequeña fracción del suelo de la zona de enraizamiento está en contacto directo con las raíces (Wild, 1992). También posee una importancia agrícola considerable la profundidad de enraizamiento, especialmente si es probable que haya un aporte reducido de agua o nutrientes, aquí es donde juega un papel fundamental la estructura y la textura del suelo, en lo que respecta tanto a las profundidades máximas de penetración de las raíces en el perfil del suelo, como a la capacidad de retención de agua en el suelo y la disponibilidad de esta para las raíces, lo que será de vital importancia en el

crecimiento y desarrollo radicular. Más aún teniendo en cuenta que el efecto de las condiciones físicas del suelo es a menudo un factor limitante de importancia para el crecimiento de la planta. En general, la profundidad del sistema radicular y su distribución están enormemente influenciados por la disponibilidad de agua en los distintos horizontes del suelo (Fowkes y Landsberg, 1981; Brown y Scott, 1984; Dwyer et al., 1988; Fernández et al., 1992), siendo la proliferación de raíces mucho más rápida en regiones del suelo con adecuado aporte hídrico que en regiones del suelo más secas.

Los parámetros que mejor definen la distribución del sistema radicular son la densidad de longitud radicular y la profundidad de enraizamiento (Ehlers et al., 1991), aunque existen otros parámetros como la longitud total de raíces tanto en el perfil completo como por profundidades, el diámetro de las mismas, y el número de extremos apicales que poseen.

1.3.2 Influencia de la posición del esqueje y de la aplicación hormonal

La variación en la capacidad de enraizamiento ha sido atribuida a diversos factores dependientes tanto de las condiciones medioambientales (temperatura, luz, estrés hídrico, etc.), como de las fisiológicas de la planta madre (contenidos hormonales endógenos, contenidos en carbohidratos, nutrición mineral, etc.) (Andersen, 1994; Montarone *et al.*, 1997), estando ambos tipos de factores estrechamente relacionados.

Según la porción del tallo analizada, los niveles hormonales encontrados han sido determinantes en la consecución del enraizamiento de dichas porciones (Patil y Shirol, 1991; Yoo y Kim, 1996) según la época en la que han sido obtenidos.

Esto ha sido comprobado en numerosas especies (Montarone *et al.*, 1997; Al Tury *et al.*, 1999). Hartmann *et al.* (1997) postularon que la posición del nudo en el tallo fue decisiva en la rizogénesis debido a los distintos grados de juvenilidad existentes a lo largo del mismo. Bauer *et al.* (1999) observaron que los esquejes juveniles de *Persoonia virgata* enraizaron significativamente mejor que los maduros, jugando las auxinas un papel decisivo en su enraizamiento. Todo ello nos sugiere que la topófisis (posición del esqueje en la planta) está bien relacionada con los niveles de auxinas, siendo estos variables según la época del año y el estado fisiológico de la planta.

Por otra parte, la capacidad de rizogénesis de una especie puede ser alterada mediante la aplicación de reguladores del crecimiento (Grossmann, 1990). De los distintos reguladores del crecimiento, las auxinas de síntesis, como el ácido indolbutírico (AIB), son los compuestos más comúnmente utilizado por estar directamente implicados en el proceso de enraizamiento (Liu y Reid, 1992). De hecho, son numerosas las citas que demuestran el efecto promotor de la rizogénesis de esta hormona en esquejes de diversas especies (Jarvis, 1986; Piccioni *et al.*, 1996; Lee y Suh, 1997; Khabou y Drira, 2000; Klein *et al.*, 2000).

Normalmente, la aplicación de AIB provoca la misma respuesta que el ácido indolacético (AIA) pero a concentraciones más bajas (Nordstrám y Eliasson, 1984; Copes y Mandel, 2000).

El presente trabajo fue realizado con la finalidad de explicar la capacidad de enraizamiento de esquejes de *Ziziphus lotus*, según su posición en la planta, así como la medida en que ésta se ve afectada por la aplicación exógena de AIB. Esto se llevó a cabo en el primer ensayo de enraizamiento solamente. En el resto se estudió solo la aplicación exógena de AIB.

1.3.3 Estudio de la concentración de ácido indolbutírico (AIB) en el enraizamiento de esquejes

La creciente utilización de especies silvestres con fines paisajísticos o de revegetación plantea la necesidad de obtener plántulas con características tales que se asegure al máximo el éxito de éstas en el momento del transplante y con posterioridad al mismo. La especie *Ziziphus lotus* puede tener interés como planta a usar en trabajos de revegetación y paisajismo, debido a su cada vez más falta de individuos en el sureste español, donde ha sido observada.

Se trata de una planta con grandes posibilidades que comienza a situarse bajo el punto de mira de la producción viverística. En este sentido, cabe destacar las dificultades encontradas principalmente en la recolección y manejo de sus semillas aspecto que dificulta su reproducción por esta vía de multiplicación, y que nos dirige hacia la multiplicación vegetativa.

Generalmente suele haber diferencias importantes en la capacidad de rizogénesis según el momento de enraizamiento y tipo de esqueje, cosa que estudiaremos en los ensayos. Es bien sabido que el enraizamiento puede ser alterado mediante la aplicación de reguladores del crecimiento.

El ácido indolbutírico (AIB) es un compuesto hormonal muy común, utilizado para el enraizamiento de esquejes, que ha demostrado su efecto promotor sobre la rizogénesis de esquejes de numerosas especies (Jarvis, 1986; Piccioni *et al.*, 1996; Lee y Suh, 1997; Khabou y Drira, 2000; Klein *et al.*, 2000).

Normalmente, la aplicación de AIB provoca la misma respuesta que el ácido indolacético (AIA) pero a concentraciones más bajas (Nordström y Eliasson, 1984; Copes y Mandel, 2000).

En el presente trabajo se pretendió conseguir el enraizamiento y mayor calidad de esquejes del azufaifo mediante la aplicación de ácido indolbutírico (AIB).

1.4 ESTUDIO DEL CRECIMIENTO RADICAL

En países con condiciones climáticas áridas o semiáridas, los procesos de desertificación están llegando a ser un serio problema con una progresiva pérdida de la cubierta vegetal acompañada de una rápida erosión del suelo (Naveh, 1987). El uso de especies nativas con fines de revegetación y xerojardinería es de creciente interés principalmente debido a su potencial de adaptación a condiciones adversas del medio como sequía, temperaturas extremas, salinidad, degradación de la estructura del suelo, compactación, etc. (Sánchez-Blanco *et al.*, 1998; Franco *et al.*, 2001; Pagliai *et al.*, 2002). Entre otras el azufaifo, miembro de la familia *Rhamnaceae*, es una especie nativa, de la región de Murcia y Almería, procedente de África, con una gran importancia debido a que sus ramas se entrelazan y crean un tejido impenetrable, que sirve de refugio a muchas plantas y fauna silvestre. Es considerada actualmente como una planta de gran interés para trabajos de revegetación y xerojardinería, principalmente debido a que posee una excelente capacidad de crecimiento aéreo y radical en las zonas naturales donde es localizada, así como un uso eficiente de los recursos hídricos y edáficos, y debido a que es muy interesante su estudio, ya que se encuentra en proceso de extinción en esta zona.

El uso de los minirrizotrones, permite hacer un muestreo frecuente (Brown y Upchurch, 1987), *in situ*, de forma rápida y sin destruir las raíces al realizar la observación. Además minimiza la variación de la distribución radical producida por los métodos tradicionales destructivos, que no permiten muestrear varias veces en un mismo punto.

La velocidad y forma de crecimiento radical en el suelo varían con las propiedades físicas, químicas y biológicas, el potencial genético y el clima. Como resultado, el clima, el suelo y la planta interactúan creando un medio ambiente suelo-raíz extremadamente complejo (Brown y Scott, 1984). Desde el punto de vista de las propiedades físicas del medio, la estructura, y como consecuencia de esta, la

porosidad (indicador de calidad estructural del suelo) son los factores físicos más importantes que afectan a la relación aire - agua y, por tanto, al crecimiento y a la dinámica radical de las plantas (Bruckner y Roeber, 1997; Albrecht *et al.*, 1998; Weber *et al.*, 2002; Pagliai *et al.*, 2002). Sustratos y/o medios de cultivo con una baja densidad aparente permiten un crecimiento radical adecuado y favorecen la longitud radical (Manzoor *et al.*, 1992), estando correlacionadas negativamente la porosidad y la resistencia a la penetración radical (Pagliai *et al.*, 2002). La porosidad no sólo afecta en términos físicos, también afecta a las propiedades químicas y biológicas. Igualmente, el aumento de la fertilidad del suelo, en términos de materia orgánica, mejora el potencial de agregación del suelo y por ende la estructura y el crecimiento radical (Guehl *et al.*, 1989; Albrecht *et al.*, 1998). Mezclas de sustratos con materia orgánica mostraron aceptables proporciones de aire y agua disponible que los diferenció de otros sustratos basados en arena y/o arcilla (Guehl *et al.*, 1989). Estos sustratos han proporcionado crecimientos radicales pobres y de escasa profundidad y extensión (Biasi y De Bona, 2000), principalmente como consecuencia de una densidad aparente elevada, factor físico que también tiene influencia sobre la restricción del crecimiento radical (Pfleger, 1990; Arachchi y Liyanage, 1996; Stumpf *et al.*, 1999).

El objetivo del presente estudio fue determinar la influencia del medio físico (sustrato) en la capacidad de crecimiento radical de plántulas de azufaifo destinadas a trabajos de revegetación y xerojardinería mediante el uso de contenedores transparentes.

2. OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

Ziziphus lotus es una especie de gran importancia en las comunidades de Murcia y Almería, en donde sólo quedan algunos ejemplos en las zonas bajas de las sierras prelitorales, muy dispersos y cada vez mas amenazados por las roturaciones de terrenos, por lo que estudios sobre la germinación y el enraizamiento de esquejes de esta especie son de gran interés a la hora de diseñar políticas de conservación de comunidades y hábitats protegidos.

Los objetivos de este trabajo han estado orientados hacia la obtención de planta en vivero mediante utilización de las principales técnicas reproductivas de tipo asexual, el estudio de la germinación y la evaluación de la calidad y las aptitudes de las plántulas obtenidas las cuales se muestran con una fuerte orientación hacia su uso en trabajos de revegetación de ecosistemas degradados y xerojardinería.

Las líneas principales, diferenciadas pero a la vez relacionadas entre sí, en las que se ha dividido el presente trabajo fin de carrera son:

1) El estudio de la germinación para poder determinar como se ve afectada esta germinación de sus semillas en diferentes condiciones de luz y temperatura, en distintos sustratos, la estratificación tanto en húmedo como en seco durante 2 y 4 meses, así como el golpe de calor, como método de escarificación, a distintas temperaturas elevadas y tiempos de exposición.

2) El estudio de las condiciones naturales de la planta que permiten un adecuado enraizamiento mediante la puesta en marcha de un estudio de enraizamiento de esquejes de diferentes partes de la planta, denominado como topófisis, y la modificación producida por el uso de ácido indolbutírico (AIB) aplicado de forma exógena en los distintos tipos de esquejes seleccionados.

3) La optimización del uso de la concentración de AIB en en la producción de plántulas mediante enraizamiento del tipo de esquejes que mejores condiciones presentan o que mayor aptitud presenta para la reproducción por esquejes en vivero con la finalidad principal de aprovechar al máximo los recursos disponibles.

4) El estudio de la influencia del medio o sustrato de cultivo sobre la mayor o menor capacidad de crecimiento radical de *Ziziphus lotus* y el establecimiento del sustrato más adecuado orientado al estudio del comportamiento de la plántula producida en terreno definitivo. Por este motivo se emplearon diferentes sustratos y diferentes proporciones de los mismos. También se orientó este estudio hacia la observación de la dinámica y el crecimiento radical, con la finalidad de establecer, si existiera, una relación entre el sustrato y el desarrollo radical de la especie que sirva de referencia para trabajos futuros de revegetación.

3. MATERIAL Y MÉTODOS

3.1 ENSAYOS DE GERMINACIÓN

3.1.1. ENSAYO DE VIABILIDAD DE SEMILLAS: TEST DE TETRAZOLIO

Las semillas que permanecen vivas y son capaces de germinar (crecimiento del embrión y aparición de la radícula) cuando las condiciones ambientales son adecuadas, se dice que son viables. Según esto, el que una semilla germine y el que pueda germinar son dos hechos completamente distintos. Una semilla puede germinar si está viva; que germine o no dependerá de factores externos (humedad, temperatura, etc.) o internos (letargo).

Un procedimiento para medir la viabilidad consiste en detectar el funcionamiento de la cadena respiratoria de transporte electrónico después de las primeras etapas de inhibición. Esto se consigue con el compuesto soluble e incoloro de 2, 3, 5-trifenil tetrazolio, que posee un potencial de reducción intermedio entre los transportadores de la cadena. Cuando este compuesto capta electrones del flujo respiratorio se reduce hasta un formazano insoluble de color rosa. Al ser insoluble se depositará sobre el tejido que lo ha reducido, preferentemente las células embrionarias, con lo que el embrión se teñirá de color rosa.

Material necesario:

Los materiales utilizados para llevar a cabo el test han sido:

- 50 semillas fuera del fruto.
- 5 placas petri
- Papel de filtro
- Agua destilada
- Bisturí
- Disolución de cloruro de 2, 3, 5- trifeniltetrazolio al 1‰
- Matraz aforado
- Papel de aluminio

Procedimiento:

1) Partir semillas

Se parten 50 semillas con el bisturí. La forma correcta de realizar el corte es longitudinalmente, de forma que se obtengan dos mitades idénticas (Foto 5).

2) Preparación de la disolución

La disolución que utilizaremos será al 1‰. Pesaremos 50 mg. de tetrazolio. Tomamos un matraz aforado de 50 ml y añadimos el tetrazolio, enrasando posteriormente a 50 ml con agua destilada. Tapamos el matraz con papel de aluminio para evitar que le de la luz, y agitamos hasta su completa disolución.

3) Cogemos 5 placas petri y colocamos un papel de filtro en cada una.

4) Ponemos en cada placa 10 semillas correctamente partidas, asegurándonos de que las dos mitades de cada semilla estén juntas y no se mezclen con las demás.



Foto 5. Semilla fuera del fruto (foto de la izquierda) y semilla partida longitudinalmente (derecha).

5) Bañamos las placas y las semillas con tetrazolio. Asegurándonos de que las semillas queden bien empapadas. Echaremos unos 5 ml de tetrazolio por placa.

6) Las placas se recubren con papel de aluminio para que no les de la luz, y las colocamos en una cámara a 20° C, durante 24 horas. Se tapan, ya que la luz desencadenaría la reacción haciendo que se pongan de color rosa y no podríamos distinguir las que están vivas de las que no.

7) Cuando hayan pasado 24 horas se hace el recuento de las semillas cuyo embrión se ha teñido de color rosa (Foto 6), sabiendo así el porcentaje de semillas viables.



Foto 6. Semilla teñida por el test de tetrazolio

3.1.2. ENSAYO DE SEMILLAS FUERA DEL FRUTO

En este primer ensayo de germinación, habiendo observado previamente que en el interior de cada hueso de *Ziziphus lotus* hay dos semillas pequeñas (Foto 7), tratamos de observar la germinación de estas semillas, de las cuales la mitad fueron bañadas con ácido giberélico y la otra mitad fueron escarificadas (rayadas), para observar si son factores influyentes en la germinación.

Se utilizaron 400 semillas de *Ziziphus lotus*, mediante su partición con unos alicates, lo que nos permitió obtener unas dos semillas por cada hueso.

De estas 400 semillas, la mitad fueron rayadas (escarificadas), para favorecer la absorción de agua, mientras que la otra mitad no. Esto se hizo para ver si esta escarificación de la cubierta era un factor influyente en la germinación. Dicha escarificación se realizó con la ayuda de una lupa, de unas pinzas y de un papel de lija, rayándolas solo un poco por uno de los laterales, hasta que se pudiera ver algo el endospermo.

Del mismo modo, de esas 400 semillas, la mitad también fueron bañadas en ácido giberélico y la otra mitad no, para poder evaluar el efecto del GA₃ sobre la germinación, tanto en semillas normales como en las semillas escarificadas.



Foto 7. Se observan dos semillas de *Ziziphus lotus* dentro de dos cavidades, al partir por la mitad la cáscara que las protege.

Para la realización del ensayo se utilizaron 12 placas petri, dentro de las cuales se colocó un papel de filtro en su base, y encima de cada papel de filtro se colocaron 25 semillas, quedando distribuidas las placas de la siguiente manera:

- 4 placas con 25 semillas normales bañadas en GA₃
- 4 placas con 25 semillas normales sin GA₃
- 4 placas con 25 semillas escarificadas bañadas en GA₃
- 4 placas con 25 semillas escarificadas sin GA₃

Las semillas fueron pesadas antes de regarlas, y se procedió a su pesado a las 24 horas y a las 48 horas después de estar ya regadas y puestas en las cámaras, para poder ver y evaluar la absorción de agua de las semillas.

Las semillas se repartieron bien por todas las placas, y las placas a las que les correspondía GA₃ fueron regadas con 4-5 ml de una dilución de GA₃ mientras que las demás fueron regadas con unos 4-5 ml de agua destilada. Para la preparación del ácido giberélico se utilizaron 0,5 gramos de GA₃ en 50 ml de agua destilada, dentro de un matraz aforado de 50 ml. Se tapó con papel de aluminio, y se agitó fuertemente para su correcta dilución.

Las placas, una vez regadas y preparadas, fueron rotuladas con el tipo de almacenamiento que habían tenido y el tratamiento al que fueron sometidas, además del número de placa, ya que para cada tratamiento se preparan 4 réplicas de 25 semillas cada una. Posteriormente fueron puestas en una cámara de germinación a 30° C en completa oscuridad (Foto 8) y fueron selladas con parafilm para evitar la pérdida de agua durante el ensayo.

El conteo de las semillas germinadas se hacía cada 2-3 días, y consistía en contar las semillas que habían germinado en cada placa eliminándolas con unas pinzas evitando así confusiones en los siguientes conteos, y se añadían unas gotas de agua destilada en caso de que lo necesitaran, ya que las semillas absorben agua y además se evapora gran cantidad debido a la temperatura de la cámara. El conteo se

realizó el segundo día después de haber realizado la siembra, y así cada 2-3 días. Se realizaron en total 7 mediciones.



Foto 8. Cámaras de germinación

El criterio para determinar que una semilla había germinado, era cuando la radícula había atravesado la cubierta seminal y había alcanzado como mínimo 1 mm. de longitud (Foto 9).



Foto 9. Semillas germinadas

El material utilizado fue:

- Placas petri
- Papel de filtro
- Pinzas
- Agua destilada
- Ácido giberélico
- Cámara de germinación a 30° C con control de luz y temperatura
- Parafilm

La nomenclatura usada para los tratamientos es:

- T : Semillas testigo
- TG : Semillas normales tratadas con GA₃
- E : Semillas escarificadas
- EG : Semillas escarificadas con GA₃

Los datos obtenidos de porcentaje final de germinación fueron sometidos a un análisis ANOVA multifactorial para determinar como afectan cada uno de los factores y sus interrelaciones a los parámetros estudiados. Los datos del porcentaje final de germinación fueron transformados mediante la función arcoseno para asegurar su normalidad. En función de los resultados se llevaron a cabo análisis ANOVA simple para cada uno de los factores, así como la prueba de Tuckey para detectar diferencias significativas ($\alpha = 0.05$) en las comparaciones entre pares de ensayos.

3.1.3. ENSAYO EN DISTINTOS SUSTRATOS EN INVERNADERO

En este ensayo, se utilizaron huesos de *Ziziphus lotus*, y lo que se pretende es saber si es posible obtener buena germinación de la siembra directa de huesos de *Ziziphus lotus*, tratando de averiguar a la vez cuál es la época ideal para la siembra bajo temperatura ambiente y ver que sustrato es mejor y más adecuado para la germinación (turba, tierra, mezcla turba-tierra).

Para su realización se utilizaron directamente huesos de *Ziziphus lotus*, de los cuales 915 huesos fueron sumergidos en agua caliente (a 50-60°C) durante 10-12 horas y dejando enfriar ese tiempo en agua, y otros 420 huesos no fueron tratadas de ningún modo.

Se utilizaron dos tipos de bandejas. 18 bandejas forestales de 35 alveolos (7×5) de poliestireno de color negro, y otras 10 bandejas de 60 alveolos (10×6) de poliestireno de color negro. Los sustratos utilizados fueron tierra, turba y una mezcla de turba y tierra (1:1).

Para la siembra, las bandejas se rellenaron cada una con su correspondiente sustrato, dejando un centímetro entre la parte superior de la bandeja y el sustrato propiamente dicho. Los huesos se enterraron no muy profundos (2 cm), y todas las bandejas fueron tapadas con vermiculita fina, con el fin de mantener la humedad entre riego y riego.

Las bandejas fueron colocadas bajo invernadero en una banqueta (Foto 10), a excepción de 3 bandejas que se pusieron en el umbráculo. Los riegos fueron realizados cada 3 días, con el fin de mantener la humedad del sustrato.



Foto 10. Bandejas ya sembradas colocadas bajo invernadero en banqueta

En total se plantaron:

Bajo invernadero:

- 3 bandejas (7×5) de tierra con huesos sin tratar.
- 3 bandejas (7×5) de turba con huesos sin tratar.
- 3 bandejas (7×5) de mezcla con huesos sin tratar.
- 3 bandejas (7×5) de tierra con huesos tratados a 50-60°C
- 3 bandejas (7×5) de turba con huesos tratados a 50-60°C
- 3 bandejas (7×5) de mezcla con huesos tratados a 50-60°C
- 10 bandejas (10×6) de turba con huesos tratados a 50-60°C

Bajo umbráculo:

- 3 bandejas (7×5) de turba con huesos sin tratar.

Los conteos de germinación se hacían cada tres días, y se consideraba germinada cuando asomaba por el sustrato parte de los cotiledones.

La nomenclatura usada para la numeración de los tratamientos fue:

T60 : Sustrato Tierra y huesos tratados a 60°C

T : Sustrato Tierra

TB60 : Sustrato Turba y huesos tratados a 60°C

TB : Sustrato Turba

M60 : Sustrato Mezcla y huesos tratados a 60°C

M : Sustrato Mezcla

Los datos obtenidos de porcentaje final de germinación fueron sometidos a un análisis ANOVA multifactorial para determinar como afectan cada uno de los factores y sus interrelaciones a los parámetros estudiados. Los datos del porcentaje final de germinación fueron transformados mediante la función arcoseno para asegurar su normalidad. En función de los resultados se llevaron a cabo análisis ANOVA simple para cada uno de los factores, así como la prueba de Tuckey para detectar diferencias significativas ($\alpha = 0.05$) en las comparaciones entre pares de ensayos.

3.1.4. ENSAYO A DISTINTAS TEMPERATURAS BAJO SUSTRATO

Este ensayo se realizó para comprobar la respuesta germinativa de los huesos de *Ziziphus lotus* bajo distintas temperaturas controladas mediante cámaras de germinación. El sustrato utilizado para realizar el ensayo fue turba.

Se utilizaron 800 huesos de *Ziziphus lotus* que fueron tratadas a 50-60°C para intentar promover su germinación, y 8 bandejas de plástico negro sin alveolos, que fueron rellenas de turba y cubiertas con una capa de vermiculita fina, con el fin de mantener la humedad del sustrato.

En dichas bandejas fueron sembrados los huesos a una profundidad de dos cms. Se sembraron 100 huesos por bandeja, estando separadas en dos grupos de 50 huesos (Foto 11).

Se utilizaron cuatro cámaras de germinación a las siguientes temperaturas:

- 2 bandejas en cámara a 20° C : Tratamiento 1
- 2 bandejas en cámara a 12-22°C : Tratamiento 2
- 2 bandejas en cámara a 30°C: Tratamiento 3
- 2 bandejas en cámara a 15°C : Tratamiento 4



Foto 11. Detalle de una de las bandejas con plantas ya germinadas, situada dentro de una cámara de germinación.

Los riegos se realizaron cada 3 días durante el tiempo que duró el ensayo y conforme germinaba algún hueso se anotaba el día de su germinación.

El ensayo duró 2 meses, en el cual se hicieron el recuento total de huesos germinados y los cálculos correspondientes.

El criterio para determinar que un hueso había germinado, era cuando la radícula había atravesado la cubierta seminal y había alcanzado como mínimo 1 mm. de longitud.

3.1.5. ENSAYO DE ESCARIFICACIÓN TÉRMICA

Este ensayo trata de comprobar y estudiar la influencia de las temperaturas elevadas sobre la germinación de las semillas incluidas en el hueso de *Ziziphus lotus*, al mismo tiempo que también se ha utilizado la misma dilución de GA₃ utilizada anteriormente, para poder determinar si también es un factor influyente en dicha germinación.

Para la realización de este ensayo se utilizaron 400 huesos distribuidos en 20 placas petri del siguiente modo:

- 5 placas con 20 huesos control.
- 5 placas con 20 huesos control y tratados con GA₃
- 5 placas con 20 huesos tratados a 60°C
- 5 placas con 20 huesos tratados a 60°C y con GA₃

Cada placa petri llevaba en su interior un papel de filtro, y los huesos fueron colocados encima y bien distribuidos.

El tratamiento a 60°C se llevó a cabo en un recipiente metálico, en donde 200 huesos fueron introducidos toda la noche y se dejaron enfriar. El tratamiento de GA₃ se le realizó a otros 200 huesos, siendo introducidos durante 24 horas en una solución de GA₃ enrasada hasta 200 ml con agua destilada.

Una vez puestas los huesos en las placas, se colocó otro papel de filtro cubriéndolos, y fue humedecido con GA₃ o con agua destilada, según los huesos de cada placa.

Las placas, una vez regadas y preparadas, fueron rotuladas con el tipo de almacenamiento que habían tenido y el tratamiento al que fueron sometidos los huesos, además del número de placa, ya que para cada tratamiento se prepararon 5 réplicas de 20 huesos cada una. Posteriormente fueron puestas en una cámara de

germinación a 30° C en completa oscuridad y fueron selladas con parafilm para evitar la pérdida de agua durante el ensayo.

El conteo de los huesos germinados se hacía cada 2-3 días, y consistía en contar los huesos que habían germinado en cada placa eliminándolos con unas pinzas evitando así confusiones en los siguientes conteos, y se añadían unas gotas de agua destilada en caso de que lo necesitaran. El primer conteo se realizó a los diez días de la siembra, y ya posteriormente cada 2-3 días durante algo más de un mes, cuando ya no se vio el menor atisbo de germinación.

El criterio para determinar que un hueso había germinado, era cuando la radícula había atravesado la cubierta seminal y había alcanzado como mínimo 1 mm. de longitud.

El material utilizado fue:

- Placas petri
- Papel de filtro
- Pinzas
- Agua destilada
- Ácido giberélico
- Cámara de germinación a 30° C con control de luz y temperatura
- Parafilm

La nomenclatura usada para la numeración de los tratamientos fue:

T : Huesos tratados a 60°C

TG : Huesos tratados a 60°C y con GA₃

C : Huesos control

CG : Huesos control tratados con GA₃

3.1.6 ENSAYOS DE ESTRATIFICACIÓN

3.1.6.1 Primer ensayo: Estratificación con alternancia de temperaturas 4-20°C

En este primer ensayo de estratificación, los huesos de *Ziziphus lotus* se sometieron a una alternancia de temperaturas de 4°C y de 20°C, coincidiendo con 12 horas de oscuridad y 12 horas de luz respectivamente. Se trataba de evaluar si estos cambios de temperatura son factores influyentes en la germinación y la rotura de la cubierta de los huesos o frutos.

Así mismo, a la mitad de los huesos se les realizó un tratamiento con GA₃, para ver también su efecto sobre la germinación en condiciones de alternancia de temperaturas.

Para la realización de este ensayo se utilizaron 200 huesos distribuidos en 10 placas Petri del siguiente modo:

- 5 placas con 20 huesos puestas a germinar con alternancia de temperatura cada 12 horas en oscuridad a 4°C y 20°C.
- 5 placas con 20 huesos tratados durante 24 horas con GA₃ puestas a germinar con alternancia de temperaturas cada 12 horas en oscuridad a 4°C y 20°C

Se utilizaron 100 ml de preparación de ácido giberélico disuelto en agua destilada, a razón de 0,1 gramos de GA₃ por 100 ml de agua destilada. Una vez enrasado, se agitó para su correcta dilución, y posteriormente se colocaron los huesos durante 24 horas.

Se utilizaron placas Petri dentro de las cuales se colocó un papel de filtro en su base y encima de él se pusieron 20 huesos, tapándolos con otro papel de filtro. Se procuró que los huesos quedaran lo mejor repartidas posible por toda la placa y seguidamente se humedeció cada placa con 4-5 ml de agua destilada o de ácido

giberélico. El papel de filtro que los cubría tiene por misión evitar que pierdan demasiada agua las placas manteniendo húmedas a los huesos también en su cara superior, además de evitar que se muevan demasiado dentro de la placa al manipularlos; proporcionándonos así unos datos más fiables.

Las placas fueron selladas con parafilm, y rotuladas con el tipo de almacenamiento que habían tenido y el tratamiento al que se iban a someter, además del número de placa, ya que para cada tratamiento se prepararon 5 réplicas de 20 huesos cada una.

El conteo de los huesos germinados se hacía cada 3 días, y consistía en contar los huesos que habían germinado en cada placa eliminándolos con unas pinzas evitando así confusiones en los siguientes conteos, y se añadían unas gotas de agua destilada en caso de que lo necesitaran. El primer conteo se realizó a los siete días de la siembra, y ya posteriormente cada 3 días durante un mes y medio.

El criterio para determinar que un hueso había germinado, era cuando la radícula había atravesado la cubierta seminal y había alcanzado como mínimo 1 mm. de longitud.

El material utilizado fue:

- Placas petri
- Papel de filtro
- Pinzas
- Agua destilada
- Ácido giberélico
- Cámara de germinación a 20° C con control de luz y temperatura
- Parafilm

La nomenclatura usada para la numeración de los tratamientos es:

T : Huesos sin tratar

TG : Huesos tratados con ácido giberélico

3.1.6.2 Segundo ensayo: Estratificación fría seca y húmeda durante dos meses

En este segundo ensayo los huesos se han sometido a temperaturas de 4°C durante un período de dos meses y bajo distintas condiciones:

- Almacenados en frío (4° C) y en seco, para lo cuál los huesos se pusieron en un tubo de cristal en el frigorífico. Se utilizaron 200 huesos.
- Almacenadas en frío (4° C) y en húmedo, para lo cual, los huesos se colocaron en perlita húmeda. Se utilizaron 200 huesos.

Transcurridos los 2 meses y para evaluar el efecto de la estratificación sobre la germinación de los huesos de *Ziziphus*, se prepararon ensayos de germinación con los huesos expuestos a las condiciones anteriores, además, de darles a la mitad de los huesos en seco y a la mitad de los huesos en húmedo un tratamiento de GA₃.

Para la realización del ensayo se utilizaron 400 huesos distribuidos en 20 placas Petri del siguiente modo:

- 5 placas con 20 huesos del tratamiento de frío en seco
- 5 placas con 20 huesos del tratamiento de frío en seco, tratadas durante 24 horas con GA₃
- 5 placas con 20 huesos del tratamiento de frío en húmedo.
- 5 placas con 20 huesos del tratamiento de frío en húmedo, tratadas durante 24 horas con GA₃

Para la realización del tratamiento de GA₃, el procedimiento fue el mismo que viene detallado en ensayos anteriores.

Se utilizaron placas Petri dentro de las cuales se colocó un papel de filtro en su base y encima de él pusimos 20 huesos, tapándolas con otro papel de filtro. Se procuró que los huesos quedaran lo mejor repartidos posible por toda la placa y

seguidamente se humedeció cada placa con 4-5 ml de agua destilada o de ácido giberélico.

Las placas fueron selladas con parafilm, y rotuladas con el tipo de almacenamiento que habían tenido y el tratamiento al que se iban a someter, además del número de placa, ya que para cada tratamiento se prepararon 5 réplicas de 20 huesos cada una. Posteriormente fueron puestas en una cámara de germinación a 30° C en completa oscuridad.

El conteo de los huesos germinados se hacía cada 2-3 días, y consistía en contar los huesos que habían germinado en cada placa eliminándolas con unas pinzas evitando así confusiones en los siguientes conteos, y se añadían unas gotas de agua destilada en caso de que lo necesitaran. El primer conteo se realizó a los dos días de la siembra, y ya posteriormente cada 2-3 días durante un mes.

El criterio para determinar que una semilla había germinado, era cuando la radícula había atravesado la cubierta seminal y había alcanzado como mínimo 1 mm. de longitud.

El material utilizado fue:

- Placas petri
- Papel de filtro
- Pinzas
- Agua destilada
- Ácido Giberélico
- Cámara de germinación a 30° C
- Parafilm

La nomenclatura usada para la numeración de los tratamientos es:

S : Huesos conservados en seco

SG : Huesos conservados en seco tratados con ácido giberélico.

H : Huesos conservados en húmedo

HG : Huesos conservados en húmedo con ácido giberélico.

3.2 ENSAYOS DE ENRAIZAMIENTO POR ESQUEJES

3.2.1 PRIMER ENSAYO (OCTUBRE 2005)

Se realizó una batería de ensayos espaciados en el tiempo para intentar averiguar si la planta es susceptible de enraizar en determinadas épocas del año. A la vez, se combinó el estudio de otros factores como la aplicación de distintas dosis de AIB o la topófisis.

Material vegetal

La planta de *Ziziphus lotus*, fue seleccionada en su localización natural y al final del estado de floración. De la planta, se cortaron diversas brotaciones del año, de las que se obtuvieron los esquejes.

Elaboración de los esquejes (topófisis)

En este primer ensayo, se utilizaron esquejes de tres posiciones diferentes (apicales, medios y basales), cortados de la planta de *Ziziphus lotus*, desechándose aquellos que correspondían a las posiciones intermedias entre las tres seleccionadas.

En este ensayo se estudió el efecto de la concentración de AIB (ácido indolbutírico) sobre el enraizamiento, además de la influencia de la posición del esqueje (topófisis) en dicho enraizamiento.

El corte se hizo siempre por debajo de las yemas o nudos. Los esquejes fueron limpiados y la totalidad de sus hojas eliminadas.

Plantación e infraestructura de cultivo

Cada esqueje cortado presentaba unos 10 centímetros de longitud (de al menos 3 yemas o nudos) y $1,42 \pm 0,2$, $2,2683 \pm 0,5$ y $7,988 \pm 2$ centímetros de diámetro en la base de esquejes apicales, medios y basales respectivamente. El 4 de Octubre de 2005 tuvo lugar la recolección y corte de los esquejes. Una vez elaborados, los esquejes fueron sumergidos durante 5 minutos en una solución funguicida-bactericida con sulfato 8-hidroxiquinoleina (BELTANOL 50% p/v) a una concentración de 1 ml/l. Seguidamente se procedió a la inmersión durante 15 minutos de los 2-3 centímetros

basales (sin tocar la yema) de los esquejes en soluciones acuosas que contenían AIB (EXUBERONE 0,4 % p/v) a tres concentraciones (250, 500 y 1000 ppm). Los esquejes sin tratamiento hormonal actuaron de control. A todos los tratamientos se les echó 1ml/l de mojante (Etaldina S).

Los esquejes se plantaron en bandejas de polietileno de 5 litros de volumen llenas con vermiculita de granulometría fina. Las bandejas fueron colocadas en camas calientes cubiertas por un film de PE transparente de 50 µm. Las mesas estuvieron colocadas dentro de un invernadero de 100 m² cubierto con placa ondulada de policarbonato.

En las Fotos 12 y 13 pueden apreciarse la ubicación y colocación de las mesas en módulo de invernadero, la colocación de las bandejas en las mismas, y los tres tipos de esquejes utilizados para este primer ensayo.

La plantación se realizó el 4 de Octubre de 2005 con 20 esquejes por bandeja, de los cuales 10 correspondían a un tratamiento y los otros 10 a otro de manera aleatoria, en un total de 14 bandejas.

Los tratamientos fueron los siguientes:

- Esquejes apicales:

- 10 esquejes en 250 ppm con 3 réplicas (30 esquejes).
- 10 esquejes en 500 ppm con 3 réplicas (30 esquejes).
- 10 esquejes en 1000 ppm con 3 réplicas (30 esquejes).
- 10 esquejes control con 3 réplicas (30 esquejes).

- Esquejes medios:

- 10 esquejes en 250 ppm con 3 réplicas (30 esquejes).
- 10 esquejes en 500 ppm con 3 réplicas (30 esquejes).
- 10 esquejes en 1000 ppm con 3 réplicas (30 esquejes).
- 10 esquejes control con 3 réplicas (30 esquejes).

- Esquejes basales:

- 10 esquejes en 250 ppm.
- 10 esquejes en 500 ppm.
- 10 esquejes en 1000 ppm.
- 10 esquejes control.



Foto 12. Detalle de los diferentes tipos de esquejes utilizados (basal, apical y medio) y en la foto de la derecha, las bandejas con los esquejes en la cama caliente.



Foto 13. Detalle de las mesas de enraizamiento y del sistema de nebulización utilizado durante el período de enraizamiento de los esquejes.

La aportación de calor se realizó mediante paneles radiantes. La temperatura del medio de enraizamiento fue fijada mediante el termostato del panel radiante en 25 °C de manera controlada, consiguiendo una temperatura del sustrato durante el período del enraizamiento de $26,28 \pm 8^\circ\text{C}$.

Las aportaciones hídricas en las bandejas fueron realizadas cada 2-3 días a demanda, manteniendo el sustrato en un nivel adecuado de humedad, mediante riegos por nebulización.

Determinaciones y parámetros medidos

Transcurridos 30 días desde la plantación de los esquejes, se procede a realizar su recuento y observar y determinar el número de raíces y de brotes por tratamiento.

3.2.2 SEGUNDO ENSAYO (ENERO 2006)

Material vegetal

La planta de *Ziziphus lotus*, fue seleccionada en su localización natural. De la planta, se cortaron diversas brotaciones del año, de las que se obtuvieron los esquejes.

Elaboración de los esquejes

A diferencia del primer ensayo, en este segundo ensayo solo se utilizaron esquejes basales, por lo que solo se estudió el efecto de la concentración de AIB (ácido indolbutírico) sobre el enraizamiento.

El corte, al igual que antes, se hizo siempre por debajo de las yemas o nudos. Los esquejes fueron limpiados y la totalidad de sus hojas eliminadas.

Plantación e infraestructura de cultivo

Cada esqueje cortado presentaba unos 10 centímetros de longitud (de al menos 3 yemas o nudos) y $7,087 \pm 2$ centímetros de diámetro en la base de dichos esquejes. El 12 de Enero de 2006 tuvo lugar la recolección y corte de los esquejes. Una vez elaborados, los esquejes fueron sumergidos durante 5 minutos en una solución funguicida-bactericida con sulfato 8-hidroxiquinoleina (BELTANOL 50% p/v) a una concentración de 1 ml/l. Seguidamente se procedió a la inmersión durante 15 minutos de los 2-3 centímetros basales (sin tocar la yema) de los esquejes en soluciones acuosas que contenían AIB (EXUBERONE 0,4 % p/v) a tres concentraciones (50, 100 y 200 ppm). Los esquejes sin tratamiento hormonal actuaron de control. A todos los tratamientos se les echó 1ml/l de mojante (Etaldina S).

Los esquejes se plantaron en bandejas de polietileno de 5 litros de volumen llenas con vermiculita de granulometría fina. Las bandejas fueron colocadas en camas calientes cubiertas por un film de PE transparente de 50 μm . Las mesas estuvieron colocadas dentro de un invernadero de 100 m² cubierto con placa ondulada de policarbonato.

La plantación se realizó el 12 de Enero de 2006 con 30 esquejes por bandeja, de los cuales 15 correspondían a un tratamiento y los otros 15 a otro de manera aleatoria, en un total de 6 bandejas.

En la Foto 14, puede observarse con detalle el tipo de esqueje basal utilizado para el ensayo, así como la disposición de los esquejes en las bandejas.

Los tratamientos fueron los siguientes:

- Esquejes basales:

- 15 esquejes en 50 ppm con 3 réplicas (45 esquejes).
- 15 esquejes en 100 ppm con 3 réplicas (45 esquejes).
- 15 esquejes en 200 ppm con 3 réplicas (45 esquejes).
- 15 esquejes control con 3 réplicas (45 esquejes).

La aportación de calor se realizó mediante paneles radiantes. La temperatura del medio de enraizamiento fue fijada mediante el termostato del panel radiante en 20 °C de manera controlada, consiguiendo una temperatura del sustrato durante el período del enraizamiento de $23,61 \pm 8^{\circ}\text{C}$.

Las aportaciones hídricas en las bandejas fueron realizadas cada 2-3 días a demanda, manteniendo el sustrato en un nivel adecuado de humedad, mediante riegos por nebulización.

Determinaciones y parámetros medidos

Transcurridos 30 días desde la plantación de los esquejes, se procede a realizar su recuento y observar y determinar el número de raíces y de brotes por tratamiento.

Así mismo, debido a la aparición de pequeñas lenticelas o grietas, se procede también a su medida, tanto transversal como longitudinal, así como el número de lenticelas en un centímetro de sección del esqueje.



Foto 14. Distribución de los esquejes en la bandeja (imagen superior) y detalle de un esqueje basal utilizado para el ensayo (imagen inferior).

3.2.3 TERCER ENSAYO (FEBRERO 2006)

Material vegetal

La planta de *Ziziphus lotus*, fue seleccionada en su localización natural. De la planta, se cortaron diversas brotaciones del año, de las que se obtuvieron los esquejes.

Elaboración de los esquejes

En este tercer ensayo sólo se utilizaron esquejes basales, por lo que solo se estudió el efecto de la concentración de AIB (ácido indolbutírico) sobre el enraizamiento. A diferencia del segundo ensayo las concentraciones utilizadas de AIB fueron de 250, 500 y 1000 ppm.

El corte, al igual que antes, se hizo siempre por debajo de las yemas o nudos. Los esquejes fueron limpiados y la totalidad de sus hojas eliminadas.

Plantación e infraestructura de cultivo

Cada esqueje cortado presentaba unos 10 centímetros de longitud (de al menos 3 yemas o nudos) y $7,043 \pm 2$ centímetros de diámetro en la base de dichos esquejes. El 7 de Febrero de 2006 tuvo lugar la recolección y corte de los esquejes. Una vez elaborados, los esquejes fueron sumergidos durante 5 minutos en una solución funguicida-bactericida con sulfato 8-hidroxiquinoleina (BELTANOL 50% p/v) a una concentración de 1 ml/l. Seguidamente se procedió a la inmersión durante 15 minutos de los 2-3 centímetros basales (sin tocar la yema) de los esquejes en soluciones acuosas que contenían AIB (EXUBERONE 0,4 % p/v) a tres concentraciones (250, 500 y 1000 ppm). Los esquejes sin tratamiento hormonal actuaron de control. A todos los tratamientos se les echó 1ml/l de mojante (Ealdina S).

Los esquejes se plantaron en bandejas de polietileno de 5 litros de volumen llenas con vermiculita de granulometría fina. Las bandejas fueron colocadas en camas calientes cubiertas por un film de PE transparente de 50 μm . Las mesas estuvieron colocadas dentro de un invernadero de 100 m² cubierto con placa ondulada de policarbonato.

La plantación se realizó el 7 de Febrero de 2006 con 20 esquejes por bandeja, de los cuales 10 correspondían a un tratamiento y los otros 10 a otro, de manera aleatoria, en un total de 6 bandejas.

Los tratamientos fueron los siguientes:

- Esquejes basales:

- 10 esquejes en 250 ppm con 3 réplicas (30 esquejes).
- 10 esquejes en 500 ppm con 3 réplicas (30 esquejes).
- 10 esquejes en 1000 ppm con 3 réplicas (30 esquejes).
- 10 esquejes control con 3 réplicas (30 esquejes).

La aportación de calor se realizó mediante paneles radiantes. La temperatura del medio de enraizamiento fue fijada mediante el termostato del panel radiante en 20 °C de manera controlada, consiguiendo una temperatura del sustrato durante el período del enraizamiento de $23,7\pm 6^{\circ}\text{C}$.

Las aportaciones hídricas en las bandejas fueron realizadas cada 2-3 días a demanda, manteniendo el sustrato en un nivel adecuado de humedad, mediante riegos por nebulización.

Determinaciones y parámetros medidos

Transcurridos 45 días desde la plantación de los esquejes, se procede a realizar su recuento y observar y determinar el número de raíces y de brotes por tratamiento.

Así mismo, debido a la aparición de pequeñas lenticelas o grietas, se procede también a su medida, tanto transversal como longitudinal, así como el número de lenticelas en un centímetro de sección del esqueje.

3.2.4 CUARTO ENSAYO (MARZO 2006)

Material vegetal

La planta de *Ziziphus lotus*, fue seleccionada en su localización natural. De la planta, se cortaron diversas brotaciones del año, de las que se obtuvieron los esquejes.

Elaboración de los esquejes

En este cuarto ensayo solo se utilizaron esquejes basales, por lo que solo se estudió el efecto de la concentración de AIB (ácido indolbutírico) sobre el enraizamiento.

El corte, al igual que antes, se hizo siempre por debajo de las yemas o nudos. Los esquejes fueron limpiados y la totalidad de sus hojas eliminadas.

Así mismo, los esquejes, nada más ser cortados, fueron introducidos en agua destilada para evitar su deshidratación y fueron pelados en su base y machacados, para eliminar las durezas y la corteza, para favorecer la absorción la hormona y del agua.

Plantación e infraestructura de cultivo

Cada esqueje cortado presentaba unos 10 centímetros de longitud (de al menos 3 yemas o nudos) y $5,422 \pm 2$ centímetros de diámetro en la base de dichos esquejes. Los días 28,29,30 y 31 de Marzo de 2006 tuvo lugar la recolección y corte de los esquejes, para las distintas preparaciones de la hormona.

En este ensayo, se utilizó AIB a 5000 ppm como solución madre, a partir de la cual se obtuvieron las dos diluciones que se utilizaron en el ensayo (25 ppm y 50 ppm).

Para preparar la dilución de 25 ppm de AIB, se extrajeron 1,25 ml de la solución madre (AIB 5000 ppm), se pusieron en un matraz aforado, y se enrasó con agua destilada hasta 250 ml. Todo este proceso se llevó a cabo en oscuridad, debidamente tapado todo con papel de aluminio, para impedir que entrara la luz, ya que puede degradar a las auxinas. Para preparar la dilución de 50 ppm se llevó a cabo el mismo procedimiento, cogiendo 2,5 ml de IBA. Para preparar la disolución testigo, se usó 1 ml de EtOH (etanol) en 100 ml de agua destilada.

Una vez preparadas las diluciones, se seleccionaron tarritos de cristal, se taparon con papel de aluminio, y en cada uno echamos 5 ml de 25 ppm, 50 ppm o de solución testigo, mediante una micropipeta pasteur.

Seguidamente, se introdujeron los esquejes, previamente cortados, pelados y machacados en su base, cada uno en un tarrito de cristal, mojando dicha zona basal. El tarro de cristal, fue sellado con parafilm, para evitar la evaporación de la hormona y del agua (Foto 15)



Foto 15. Detalle de uno de los esquejes preparado dentro de un tarrito de cristal con la hormona (imagen de la izquierda) y detalle de los 30 esquejes de un tratamiento, preparados para pasar 12, 24 o 48 horas (imagen derecha).

Para la plantación se utilizaron 90 esquejes basales, que constituyeron los tres ensayos realizados con esta hormona:

- 30 esquejes sumergidos durante 12 horas en las siguientes diluciones de AIB:
 - 10 esquejes en 25 ppm IBA
 - 10 esquejes en 50 ppm IBA
 - 10 esquejes testigo (en agua destilada)

- 30 esquejes sumergidos durante 24 horas en las siguientes diluciones de AIB:
 - 10 esquejes en 25 ppm IBA
 - 10 esquejes en 50 ppm IBA
 - 10 esquejes testigo (en agua destilada)

- 30 esquejes sumergidos durante 48 horas en las siguientes diluciones de AIB:
 - 10 esquejes en 25 ppm IBA
 - 10 esquejes en 50 ppm IBA
 - 10 esquejes testigo (en agua destilada)

Una vez transcurridas las 12, 24 o 48 horas, los esquejes sumergidos, se sacaron de los tubos, y se plantaron sin lavar previamente, en 3 bandejas de vermiculita. En cada bandeja fueron puestos 30 esquejes, y debidamente rotulados según el tratamiento. Cada bandeja fue de un tratamiento (12, 24 y 48 horas). Las bandejas fueron colocadas en una cámara a 25 °C y con 16 horas luz y tapadas con una bolsa de plástico transparente de autoclave, para mantener la humedad (Foto 16).

Las aportaciones hídricas en las bandejas fueron realizadas cada 2-3 días a demanda, manteniendo el sustrato en un nivel adecuado de humedad.

Determinaciones y parámetros medidos

Transcurridos 30 días desde la plantación de los esquejes, se procede a realizar su recuento y observar y determinar el número de raíces y de brotes por tratamiento.

Así mismo, debido a la aparición de pequeñas lenticelas o grietas, se procede también a su medida, tanto transversal como longitudinal, así como el número de lenticelas en un centímetro de sección del esqueje. También se realizó el recuento de los esquejes que en su base formaron callo y los que no.



Foto 16. Esquejes plantados en las bandejas y colocados dentro de la cámara de germinación.

***3.3 ESTUDIO DEL CRECIMIENTO RADICAL Y PARTE AÉREA
EN DISTINTOS SUSTRATOS***

Material vegetal

Se utilizaron plántulas procedentes de la germinación en bandejas de *Ziziphus lotus*, teniendo una edad aproximada de 1 mes desde su nacimiento. Constan de unas 6 hojas cada planta (Foto 17).

Contenedores transparentes y medio de cultivo

Para el estudio del crecimiento radical se utilizaron contenedores transparentes de metacrilato con una longitud de 100 cm y unos diámetros interior y exterior de 7,5 y 8 cm, respectivamente. El extremo inferior, cerrado, fue agujereado para permitir el libre drenaje del agua en el perfil de los tubos. Adicionalmente, los 4 primeros centímetros, se recubrieron con cinta aislante negra sujeta al contenedor con la finalidad de impedir la entrada de luz (Foto 18A). Con esta medida se pretendió evitar posibles alteraciones en el acercamiento de las raíces al tubo, principalmente en las capas más superficiales del sustrato, que pudieran falsear los datos de medida (McMichael y Taylor, 1987; Levan *et al.*, 1987). La longitud del contenedor fue dividida en franjas de 1 cm, mediante láminas adhesivas de material plástico transparente, previamente grabadas. A lo largo de su generatriz, también se encontraba grabada una línea recta perpendicular a las marcas horizontales, que servía de referencia de posición en las observaciones, así como la numeración de cada una de las franjas (Foto 18B).

Tras la preparación de los tubos de medida (contenedores transparentes) cada uno de ellos fue cubierto con otro de mayor diámetro de PVC opaco, al objeto de reducir al máximo la posible influencia de la radiación luminosa externa, así como la acumulación de calor en los tubos por efecto de la misma, aspectos ambos que influyen sobremanera en el desarrollo radical. Estos tubos opacos de PVC fueron retirados únicamente en los momentos en los que se realizaron las mediciones del crecimiento radical.



Foto 17. Plántulas procedentes de la germinación en bandejas, teniendo una edad aproximada de 1 mes desde su nacimiento. Constaban de unas 6 hojas cada planta. Se puede observar una raíz pivotante, sin apenas ramificaciones, por lo que su consistencia en el cepellón es muy difícil.

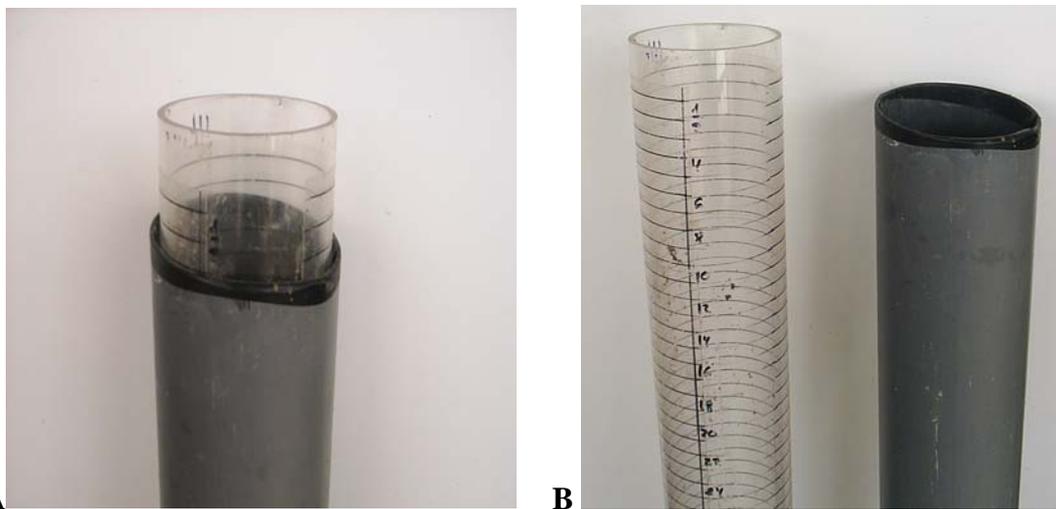


Foto 18. A) Detalle del contenedor con la cinta aislante de color negro adherida al tubo, con la finalidad de impedir la entrada de luz a la zona de crecimiento radical. B) Detalle de las líneas de división de los contenedores y la numeración seguida en cada una de las franjas establecidas.

Para el estudio de la influencia de las propiedades físicas del medio en el crecimiento radical de plántulas de azufaifo, se procedió a la preparación de una mezcla de tierra y turba negra en la proporción volumétrica 1:1. Los otros dos sustratos utilizados fueron tierra y turba negra, por separado. Las características físico-químicas de la turba negra se presentan en la tabla 1. Los sustratos utilizados fueron denominados como S1 (turba), S2 (mezcla) y S3 (tierra). Los contenedores transparentes se rellenaron con los sustratos descritos hasta casi su total capacidad (dejando 2 cm hasta el borde superior) cuidando que su adecuado y homogéneo llenado no alterara las propiedades físicas de las mezclas preparadas. La mezcla se realizó en una hormigonera, observándose un drenaje rápido y la inexistencia de grumos. Los tubos fueron recubiertos en su parte superior por una capa de un centímetro de vermiculita fina para mantener la humedad.

Infraestructura y condiciones de estudio

Las plántulas fueron cultivadas en los tubos transparentes (una planta por tubo) bajo condiciones de invernadero de 100 m² cubierto con placa ondulada de policarbonato. La plantación o trasplante a los tubos se realizó el 13 de Febrero de 2006.

Para la plantación se utilizaron 15 contenedores con los diferentes sustratos descritos anteriormente (5 tubos por cada sustrato estudiado). Los contenedores se colocaron verticales por medio de un soporte metálico que constaba de tres bloques independientes, en cada uno de las cuales se colocaron los tubos (Foto 19).

Una vez realizado el trasplante se procedió a dar un riego de implantación de 250 ml por planta. En esta operación se prestó especial atención en acomodar bien las raíces en el sustrato y procurar un buen contacto con el mismo, procurando lograr una adecuada interfase sustrato-tubo, ya que de lo contrario, el anormal crecimiento de las raíces en ella daría lugar a sobreestimaciones en las lecturas (Cheng *et al.*, 1991; Franco y Abrisqueta, 1997).



Foto 19. Detalle de los contenedores y lugar de colocación en el soporte metálico (foto superior), y detalle de las plántulas recién transplantadas a los tubos (foto inferior).

Medidas del crecimiento radical y aéreo y determinaciones

En la determinación del crecimiento radical, el método utilizado consistió en contar el número de centímetros de raíces visibles en cada sección marcada del contenedor, independientemente de su diámetro. Si una raíz pasaba de una sección a otra, apareciendo parte de la misma en ambas, se contaba en cada sección la longitud que cada raíz tenía en esa sección. En las raíces ramificadas, se contabilizaban la raíz primaria y cada una de las ramificaciones como raíces independientes. Los perfiles medidos se hicieron en intervalos de 15 cm hasta completar la profundidad máxima de los tubos (minirrizotrones).

Se hicieron tres medidas del crecimiento radical en los tubos, la primera tuvo lugar el 3 de abril de 2006 (60 días después del transplante), la segunda el 2 de mayo del mismo año (90 días después del transplante) y la tercera el 2 de junio de 2006 (120 días después del transplante). Sirva como puntualización el hecho de que las mediciones se realizaron independientemente del grado de suberización de las raíces, contabilizando éstas respecto al cómputo total de raíces en cada perfil.

El diseño experimental consistió en la distribución en bloques al azar de 5 tubos por cada una de las mezclas descritas (3 repeticiones de 5 tubos cada una distribuidas en bloques al azar), lo que supuso un total de 15 tubos para el conjunto del experimento.

Los datos obtenidos del conteo de las raíces fueron sometidos a un análisis ANOVA multifactorial para determinar como afectan cada uno de los factores y sus interrelaciones a los parámetros estudiados. Los datos de la longitud de las raíces fueron transformados mediante la función arcoseno para asegurar su normalidad. En función de los resultados se llevaron a cabo análisis ANOVA simple para cada uno de los factores, así como la prueba de Tuckey para detectar diferencias significativas ($\alpha = 0.05$) en las comparaciones entre pares de ensayos.

En la determinación del crecimiento aéreo, el método consistió en contar las hojas, altura de la planta, número de ramificaciones y longitud de las mismas, para poder establecer una comparativa entre los distintos sustratos y ver cuál es el idóneo para el desarrollo de la planta.

Tabla 1. Características físico-químicas de la turba negra comercial utilizada en el estudio

Características físico-químicas	Valor
Físicas	
Densidad aparente (g/cc)	0,35
Porosidad total	84%
Aire	7,6%
Agua fácilmente disponible	24%
Agua de reserva	4,7%
Agua difícilmente disponible	47,7%
Químicas	
CIC (meq/100 g)	260
pH	6,2
CE (dS/m)	0,8
Nitrógeno	210 ppm
Fósforo	230 ppm
Potasio	275 ppm
Magnesio	120 ppm

Fuente: Datos técnicos medios del sustrato proporcionados por la empresa productora Klasmann-Deilmann GmbH, Alemania.

4.RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 ENSAYOS DE GERMINACIÓN

4.1.1 ENSAYO DE VIABILIDAD DE SEMILLAS: TEST DE TETRAZOLIO

Del ensayo realizado para conocer la viabilidad de semillas de *Ziziphus lotus* usando el test de tetrazolio, llegamos al resultado de que el 100 % de las semillas son viables, por lo que cabe esperar porcentajes de germinación máximos.

La coloración roja de los embriones no deja lugar a dudas (Fotos 20 y 21).



Foto 20. Diferencia entre una semilla partida normal (izquierda) y otra teñida de rojo debido al test de tetrazolio (derecha).



Foto 21. Comparación entre semillas normales y otras teñidas por el tetrazolio (izquierda), y semilla partida por la mitad teñida de rojo (derecha).

4.1.2 ENSAYO DE SEMILLAS FUERA DEL FRUTO

4.1.2.1 Porcentaje final de germinación

Los resultados obtenidos de este ensayo de germinación de semillas fuera del hueso o fruto, nos muestran porcentajes altos de germinación, los cuales se muestran en la Figura 1.

Los factores considerados para ver cómo influyen en la germinación final en este ensayo son:

- Aplicación de ácido giberélico.
- Escarificación de semillas.

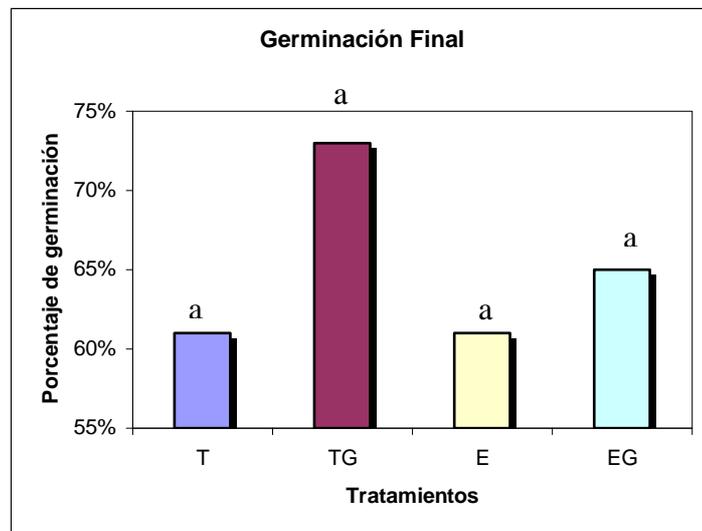


Figura 1. Porcentaje de germinación final semillas fuera del hueso o fruto para los diferentes tratamientos. Letras diferentes entre columnas indican diferencias significativas según el test de Tuckey para valores de probabilidad iguales o inferiores al 5 %.

Ni la escarificación de semillas ni la aplicación del ácido giberélico son factores influyentes en la germinación final ($F=0,789$ y $P=0,523$). Dicha germinación final osciló entre el 61 y el 73 %.

Los mayores porcentajes de germinación se obtuvieron cuando las semillas fueron tratadas solamente con ácido giberélico (TG=73 %), mientras que los porcentajes más bajos de germinación se alcanzaron para semillas testigo (T=61%) y escarificadas (E=61 %), aunque no hubo diferencias significativas entre tratamientos ($P=0.523$).

Con las semillas escarificadas y aplicando ácido giberélico (EG) se obtuvo un porcentaje de germinación similar (65 %).

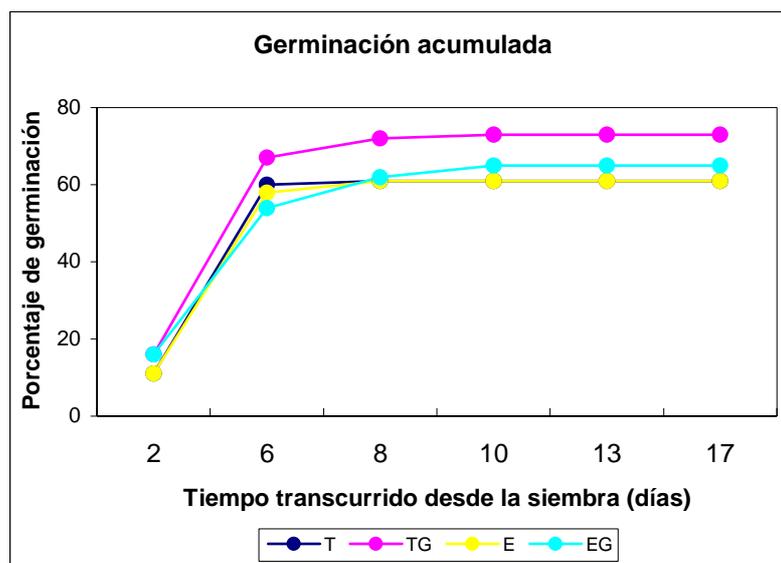


Figura 2. Germinación acumulada en función de los días transcurridos desde la siembra.

En la Figura 2, se representa la germinación acumulada a lo largo del tiempo transcurrido desde la siembra en las placas. Se puede observar una gran velocidad de germinación en los primeros 6-8 días, pero a partir de ahí, la germinación se fue estabilizando hasta alcanzar sus valores finales a partir del octavo día, a partir del cual apenas hubo germinación.

4.1.2.2 Absorción de agua de las semillas en función del tiempo

Se realizaron 3 tomas de pesos:

- Tiempo 1: 0 horas.
- Tiempo 2: 24 horas.
- Tiempo 3: 48 horas.

Según el análisis de varianza (ANOVA), no se obtuvieron diferencias significativas en el peso medio de las semillas de los cuatro tratamientos, tanto en el Tiempo 1 ($F=2,399$ y $P=0,119$), Tiempo 2 ($F=1,906$ y $P=0,182$) y Tiempo 3 ($F=3,992$ y $P=0,035$).

Así mismo, el peso medio de cada tratamiento fue aumentando en la misma proporción en todos los tratamientos y para cada tiempo, por lo que tampoco hubo diferencias significativas en este aspecto (Figura 3).

Por lo tanto, la absorción de agua de las semillas, es independiente y se realiza del mismo modo tanto si las semillas han sido escarificadas como si no lo han sido. Este hecho demuestra que las semillas no tienen impedimento físico para la germinación. Por tanto, y en vista de los resultados del tetrazolio, podría haber un 30-40 % de semillas con letargo.

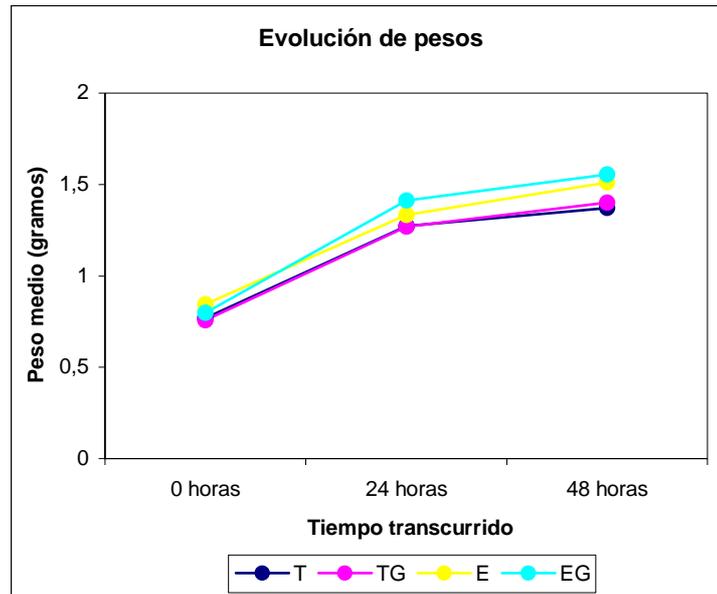


Figura 3. Evolución de pesos de las semillas en los tres períodos considerados, en donde se observa que apenas hay diferencias significativas entre los distintos tratamientos en relación a la absorción de agua por parte de dichas semillas.

4.1.3 ENSAYO EN DISTINTOS SUSTRATOS EN INVERNADERO

Los resultados obtenidos de este ensayo de germinación de huesos bajo distintos sustratos nos muestran porcentajes bajos de germinación, los cuales se muestran a continuación (Figura 4).

Los factores considerados para ver cómo influyen en la germinación final en este ensayo son:

- Tipo de sustrato: Turba (TB), mezcla (M) y tierra (T)
- Aplicación de calor: 60°C

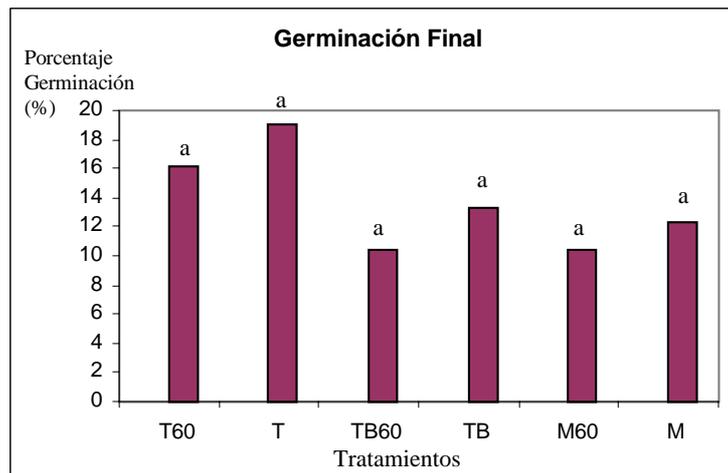


Figura 4. Porcentaje de germinación de huesos para los diferentes tratamientos. Letras diferentes entre columnas indican diferencias significativas según la prueba de Tuckey para valores de probabilidad iguales o inferiores al 5 %.

Según el análisis de varianza (ANOVA) simple, el tipo de sustrato no afectó significativamente en la germinación ($F=1,756$ y $P=0,214$), ni tampoco la aplicación de calor ($F=0,693$ y $P=0,421$), ni la interacción entre calor y sustrato ($F=0,011$ y $P=0,989$), al ser todos los valores de P mayores de 0,05.

Por lo tanto, la germinación de los huesos de *Ziziphus lotus* es independiente del tipo de sustrato utilizado y del tratamiento de calor aplicado. No son factores influyentes ni afectaron significativamente en la germinación final. Dicha germinación final osciló entre el 10,47 % y el 19,04 %.

Los mayores porcentajes de germinación se obtuvieron en huesos sembrados en tierra solamente (T=19,04 %), mientras que los porcentajes más bajos de germinación se alcanzaron para los huesos sembrados en turba y tratados a 60°C (TB60=10,47 %) y los sembrados en mezcla 1:1 y tratados también a 60°C (M60=10,47 %).

En el resto de tratamientos se obtuvieron porcentajes de germinación intermedios: huesos sembrados en tierra y tratados a 60°C (T60=16,19 %), huesos sembrados en turba (TB=13,33 %), huesos sembrados en mezcla (M=12,37 %).

En general, los porcentajes de germinación de huesos tratados a 60°C han sido ligeramente más bajos que los porcentajes de los huesos testigo, independientemente del tipo de sustrato, aunque sin diferencias significativas.

Cabe decir, que en las 10 bandejas de turba y con huesos tratados a 60°C sembradas aparte de este ensayo, se obtuvo un porcentaje de germinación del 16,16 %, similar prácticamente al obtenido en el ensayo, mientras que en las 3 bandejas de turba y con huesos sin tratar a 60°C, situadas bajo el umbráculo, se obtuvo un porcentaje de germinación del 12,38 %, también similar a los obtenidos en el ensayo, por lo que se vuelve a corroborar que es independiente el tipo de sustrato como la aplicación de calor para la germinación de los huesos de *Ziziphus lotus*.

En definitiva, se demuestra que el hueso del fruto supone un impedimento de la germinación espontánea de las semillas.



Foto 22. Detalle de una plántula brotada (imagen de la izquierda) y de las bandejas utilizadas así como la brotación que en ellas se produjo, que apenas fue diferente para cada uno de los tres sustratos utilizados

4.1.4 ENSAYO A DISTINTAS TEMPERATURAS BAJO SUSTRATO

Los resultados obtenidos en este ensayo de germinación de huesos bajo distintas temperaturas nos muestran de nuevo porcentajes bajos de germinación, los cuales se muestran en la Figura 5.

El factor considerado para ver cómo influyen en la germinación final en este ensayo es la temperatura utilizada para germinar los huesos, en distintas cámaras de germinación.

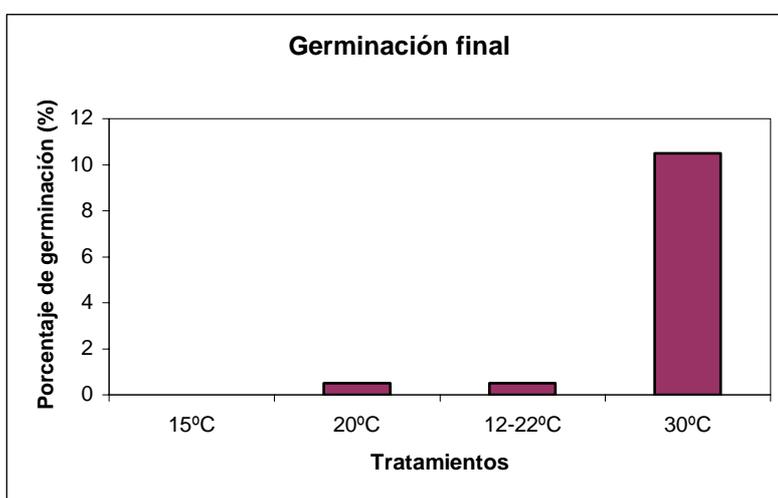


Figura 5. Porcentaje de germinación de semillas para los distintos tratamientos.

El mayor porcentaje de germinación (10,5 %) se obtuvo en las semillas con temperatura de incubación de 30°C, mientras que a la temperatura de 15°C de incubación, la germinación fue nula.

En el resto de tratamientos se obtuvieron porcentajes de germinación intermedios, en este caso coincidiendo en un 0,5 % de germinación.

En general, el único tratamiento que ha dado un resultado aceptable y superior a los demás ha sido el de las semillas a 30°C, con un 10,5 %.

Estos resultados no mejoraron los obtenidos en el apartado anterior pero nos indican que la germinación de las semillas contenidas en los huesos ocurre únicamente a temperaturas elevadas.

4.1.5 ENSAYO DE ESCARIFICACIÓN TÉRMICA

De nuevo, los resultados obtenidos de este ensayo de germinación de huesos nos muestran porcentajes bajos de germinación, los cuales se muestran en la Figura 6.

Los factores considerados para ver cómo influyen en la germinación final en este ensayo son:

- Aplicación de ácido giberélico.
- Aplicación de calor: 60° C

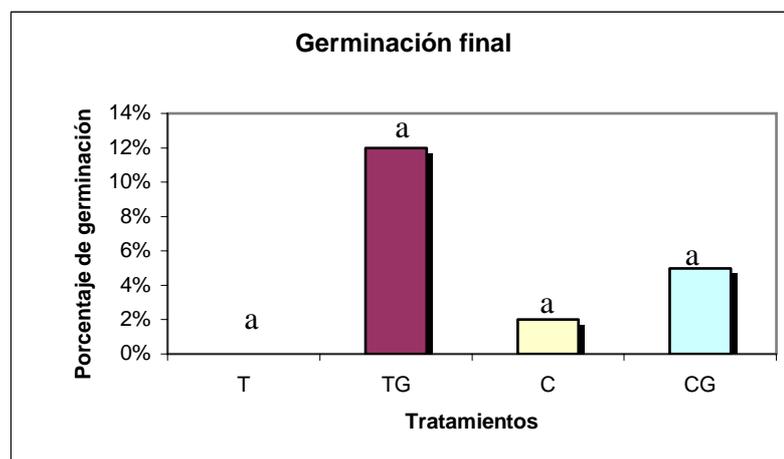


Figura 6. Porcentaje de germinación de huesos para los diferentes tratamientos de escarificación. Letras diferentes entre columnas indican diferencias significativas según la prueba de Tuckey para valores de probabilidad iguales o inferiores al 5 %.

Los mayores porcentajes de germinación se obtuvieron en huesos con aplicación de calor y tratadas con ácido giberélico (TG=12,00 %), mientras que los huesos tratados únicamente con calor la germinación fue nula.

En el resto de tratamientos se obtuvieron porcentajes de germinación intermedios pero mucho más bajos que el de los huesos tratados con calor y ácido

giberélico. En huesos sin aplicación de calor ni giberélico (C), el porcentaje de germinación fue de un 2 % y los huesos tratados únicamente con giberélico (CG), el porcentaje de germinación fue de un 5 %.

Según el análisis de varianza (ANOVA) simple, el tipo de tratamiento, no afectó significativamente en el porcentaje de germinación ($F=2,567$ y $P=0,091$), al ser $P>0,05$.

Por lo tanto, podemos decir que la germinación de los huesos no depende de la aplicación de calor y de la aplicación de ácido giberélico, aunque se observó que con la combinación de estos dos, se obtuvo un porcentaje más elevado de germinación, mientras que utilizando un tipo de tratamiento solamente, los porcentajes de germinación fueron más bajos.

No obstante, los resultados no mejoran el porcentaje de germinación del ensayo 4.1.4 y por tanto podemos decir que la presencia del hueso sigue siendo un impedimento para la germinación.

La utilización de uno solo de los tratamientos (calor o ácido giberélico), o de ninguno de ellos (semillas control), no ofrecen diferencias significativas entre ellos, y la germinación sí sería independiente del tipo de tratamiento utilizado.

4.1.6 ENSAYOS DE ESTRATIFICACIÓN

4.1.6.1 Primer ensayo: Estratificación con alternancia de temperaturas 4-20°C

En este primer ensayo de estratificación, los factores considerados para ver cómo influyen en la germinación final en este ensayo fueron la aplicación de ácido giberélico y la alternancia de temperaturas a 4-20°C.

El porcentaje de germinación resultante de este ensayo fue de un 3 % en huesos testigo (T) y de un 0 % en huesos tratados con ácido giberélico (TG).

Por lo tanto, este ensayo de estratificación con alternancia de temperaturas no ha estimulado la germinación de las semillas con respecto a otros ensayos anteriores, y ni siquiera la aplicación de ácido giberélico ha sido válida e incluso ha aletargado aún más a las semillas contenidas en los huesos.

4.1.6.2 Segundo ensayo: Estratificación fría seca y húmeda durante dos meses

En este segundo ensayo de estratificación fría durante dos meses, al igual que el anterior, ninguno de los cuatro tratamientos realizados ha servido para promover la germinación, que en este ensayo estuvo en un 0 % para los cuatro tratamientos.

Por lo tanto, para la especie *Ziziphus lotus*, la estratificación y exposición prolongada al frío, perjudica gravemente a la germinación de las semillas.

4.2 ENSAYOS DE ENRAIZAMIENTO POR ESQUEJES

4.2.1 PRIMER ENSAYO (OCTUBRE 2005)

En este primer ensayo, no enraizó ningún esqueje, ni apical, medio o basal. El porcentaje de enraizamiento fue de un 0 %, por lo que la aplicación de AIB no tuvo ningún efecto en el estudio del enraizamiento de *Ziziphus lotus*.

En cuanto a la brotación, en los esquejes apicales brotaron el 2,5 %, en los medios el 6,66 % y en los basales el 12,5 %. Hubo una mayor brotación en esquejes basales que en apicales, seguramente al ser de mayor grosor y tener más reservas para la brotación (Fotos 23 y 24).

Todos los esquejes murieron a los 45 días de la plantación, siendo los basales los que tuvieron un mayor aguante, debido principalmente a la mayor cantidad de reservas gracias a su mayor grosor, mientras que los esquejes apicales fueron los que antes murieron.

Por lo tanto, en referencia al estudio de la topófisis, tuvieron una mejor respuesta y una mayor duración los esquejes basales, de un mayor diámetro de base, seguidos de los medios y finalmente de los apicales, por lo que en los posteriores ensayos, únicamente se intentó el enraizamiento con esquejes basales.



Foto 23. Se puede observar que la brotación fue muy baja en todos los esquejes apicales y medios (arriba). En las fotos inferiores se puede observar la brotación de esquejes medios



Foto 24. Detalle de un tallo basal brotado. Se puede observar que la brotación es mucho más fuerte que en los esquejes medios o apicales.

4.2.2 SEGUNDO ENSAYO (ENERO 2006)

En este segundo ensayo tampoco hubo enraizamiento de ninguno de los esquejes. El porcentaje de enraizamiento fue de un 0 % en los tres tratamientos con hormona realizados.

A los 30 días de la plantación, la brotación fue del 100 % de los esquejes (Foto 25). A partir de esa fecha, comenzaron a marchitarse, debido a que la fuerte brotación requería una gran cantidad de agua y de nutrientes que el esqueje tomaba del sustrato, pero esto no fue suficiente, y al no echar raíces, no pudo mantenerse más tiempo. Los esquejes murieron a los 40 días de la plantación.

En este ensayo, a los 25 días, se observó que los esquejes fueron rompiendo su superficie en contacto con la vermiculita, creando una serie de grietas o lenticelas de forma ovalada (Foto 26, 27 y 28) por debajo del nudo, que se encontraba a ras de suelo, como posible método de captación de agua por esas aberturas.

Se realizaron las medidas de estas lenticelas, sacando la media de su diámetro tanto longitudinal como transversal, así como contando el número de lenticelas por centímetro de sección para determinar si tenían relación con el tratamiento realizado a los esquejes. Los resultados que aparecen en la tabla 2 son las medias en centímetros. Se contaron 20 lenticelas por esqueje aleatoriamente y se les hizo la media.

Tratamiento	Esquejes con lenticelas	Medida longitudinal	Medida transversal	Lenticelas por cm de sección.
200 ppm	84,4 %	1,50	1,24	40,3
100 ppm	68,88 %	1,76	1,36	37
50 ppm	57,77 %	1,68	1,43	33,4
Testigo	60 %	1,58	1,12	28,9

Tabla 2. Datos de las medidas de las lenticelas de los esquejes

Se puede observar según la tabla 2, que apenas hay relación entre el tamaño de las lenticelas y el tipo de tratamiento utilizado, pero sí que se observa que a mayor dosis de AIB, mayor número de lenticelas han aparecido y mayor número de esquejes con aberturas hay. En el tratamiento de 200 ppm, se puede observar que hay un 39,44 % más de lenticelas que en los esquejes testigo, teniendo los tratamientos de 100 y 50 ppm un número intermedio.

Por lo tanto, a mayor dosis de AIB, mejor responden los esquejes que en dosis demasiado bajas, aunque no promovió el enraizamiento



Foto 25. Brotación del 100 % de los esquejes. En la foto de abajo, se muestra con detalle uno de los esquejes en el que se aprecia la fuerte brotación que tuvo lugar en ellos.



Foto 26. Detalle de la base de los esquejes en los cuales se presentan las lenticelas. En la foto de la izquierda se puede ver una porción de esqueje sin lenticelas y otro con ellas.

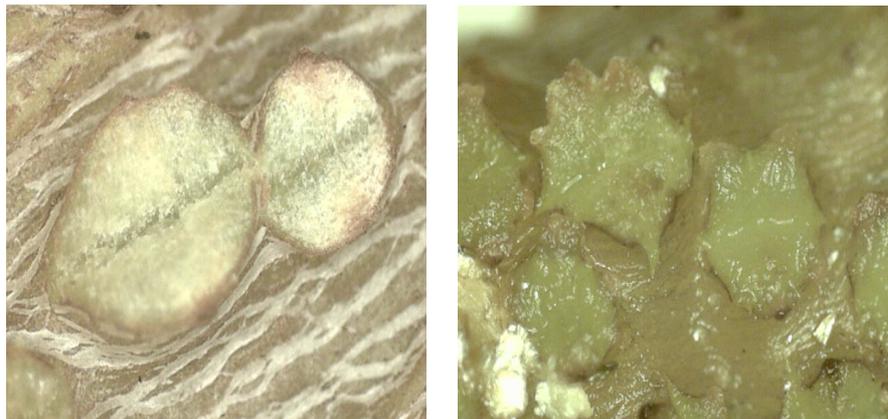


Foto 27. Detalle de las lenticelas de los esquejes.

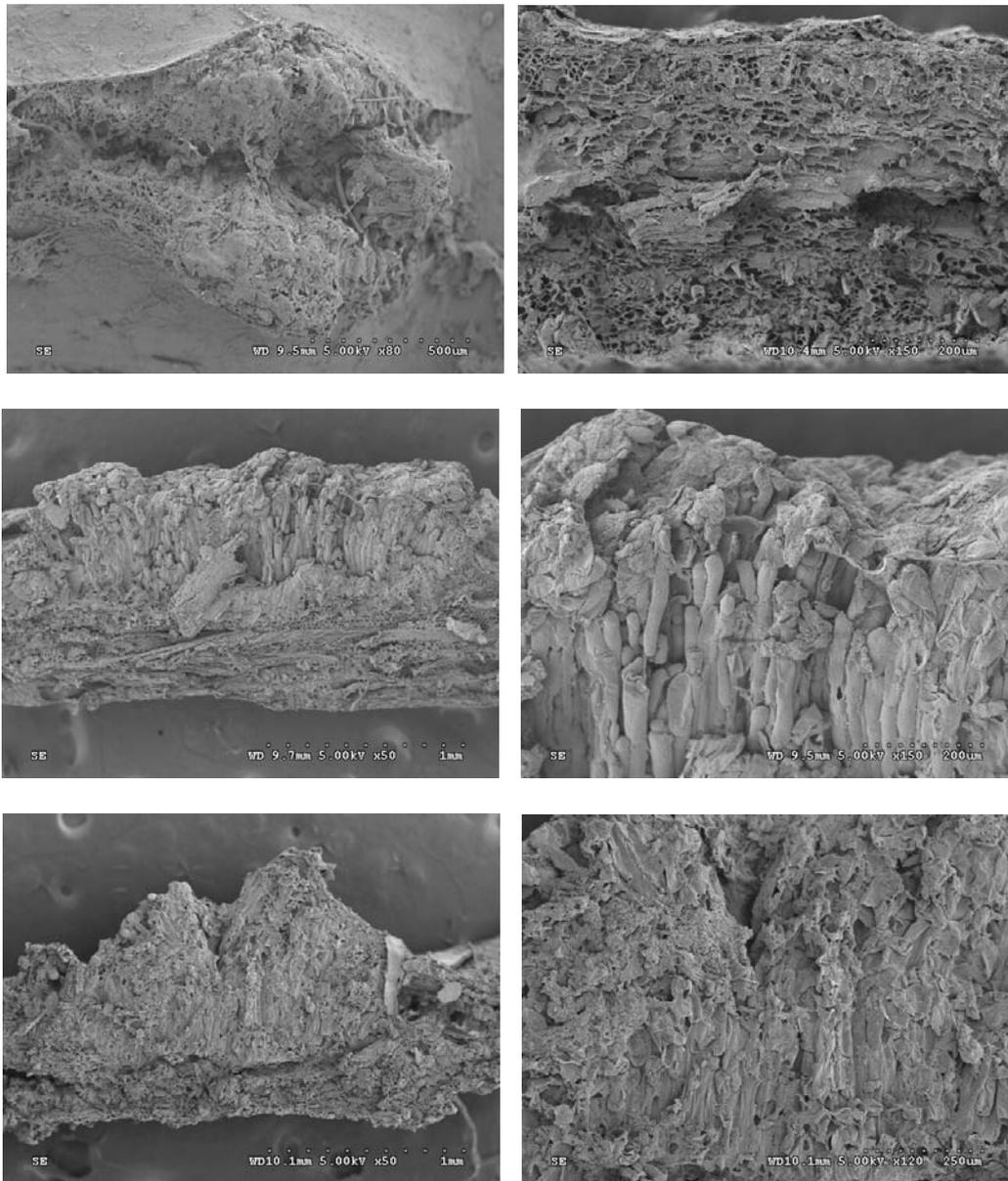


Foto 28. Detalle de las lenticelas observado por un microscopio de barrido electrónico. En las dos fotos superiores, se puede observar la superficie de la lenticela (izquierda) y un acercamiento con más detalle a esa superficie. En las dos fotos intermedias se realizó un corte longitudinal de la superficie, viéndose con más detalle en la foto de la derecha, en la que se puede apreciar lo que parecen células intentando diferenciarse. En las dos fotos inferiores se realizó un corte transversal a las lenticelas.

4.2.3 TERCER ENSAYO (FEBRERO 2006)

En este tercer ensayo tampoco se produjo enraizamiento de ninguno de los esquejes ni se observó desdiferenciación celular en la base de los esquejes.

A los 30 días de la plantación, la brotación fue del 100 % de los esquejes. Aguantaron hasta 10 días más, fecha en la que comenzaron a marchitarse, debido a que la fuerte brotación requería una gran cantidad de agua y de nutrientes que el esqueje tomaba del sustrato, pero esto no fue suficiente, y al no echar raíces, no pudo mantenerse más tiempo. Los esquejes murieron a los 40-45 días de la plantación.

Igualmente que en los esquejes del ensayo 2, aquí también aparecieron lenticelas en ellos.

Se realizaron las medidas de estas lenticelas, sacando la media de su diámetro tanto longitudinal como transversal, así como contando el número de lenticelas por centímetro de sección para determinar si tenían relación con el tratamiento realizado a los esquejes. Los resultados que aparecen en la tabla 3 son las medias en centímetros. Se contaron 20 lenticelas por esqueje aleatoriamente y se les hizo la media.

Tratamiento	Esquejes con lenticelas	Medida longitudinal	Medida transversal	Lenticelas por cm de sección.
1000 ppm	60 %	1,78	1,20	27,33
500 ppm	90 %	1,67	1,14	24,4
250 ppm	60 %	2,61	1,77	35,66
Testigo	40 %	1,95	1,23	22,5

Tabla 3. Datos de las medidas de las lenticelas de los esquejes

Se puede observar según la tabla 3, que apenas hay relación entre el tamaño de las lenticelas y el tipo de tratamiento utilizado, ni entre el número de esquejes con lenticelas y el tratamiento, ni el número de lenticelas por centímetro de sección con el tratamiento utilizado. No hay diferencias significativas, por lo tanto no podemos establecer relación alguna entre tratamientos y lenticelas.

4.2.4 CUARTO ENSAYO (MARZO 2006)

En este cuarto ensayo no se produjo enraizamiento de ninguno de los esquejes, aunque si que se observó en algunos de ellos un comienzo de diferenciación celular en forma de callo blanco, promotor de la formación de raíces. Al contrario del resto de ensayos, en éste no se formaron apenas lenticelas en los esquejes.

A los 15 días de la plantación, la brotación fue del 100 % de los esquejes, pero a partir de ahí comenzaron a marchitarse, estando a los 30 días todos muertos excepto los que formaron esa especie de callo blanquecino.

En relación a los tres tratamientos realizados (12, 24 y 48 horas en hormona) , se observó que los esquejes tratados durante 48 horas tuvieron una mayor resistencia y sobrevivieron más que los de 12 y 24 horas, que son los que primero murieron.

Dentro de los esquejes tratados a 48 horas, fue donde apareció esta pequeña diferenciación celular en forma de callo blanco, sobre todo en los esquejes tratados con 25 ppm de hormona, en donde esta diferenciación apareció en el 30 % de los esquejes , mientras que en los tratados a 50 ppm apareció solamente en el 20 % y en los esquejes testigo no apareció ninguno. Los esquejes a 25 ppm tuvieron una mayor duración también que los de 50 ppm, en donde el callo fue de menor tamaño. (Foto 29). Este callo fue formado por las auxinas que comenzaron a promover la formación de raíces, aunque al final los esquejes murieron antes de que se formaran.

De todas formas, en relación a los tres ensayos anteriores, en este se ha avanzado mucho gracias a esta formación de callo blanco, y por lo tanto será el camino a seguir para futuros ensayos de enraizamiento de esquejes, siendo la concentración de 25 ppm y aplicada durante 48 horas la que más se ha aproximado al fin de este estudio.



Foto 29. Detalle de la diferenciación celular que tuvo lugar en los esquejes tratados con hormona durante 48 horas. La foto superior en la esquina izquierda es de una concentración de hormona de 50 ppm, y el resto de 25 ppm. Se puede observar el menor tamaño del callo de 50 ppm, con respecto al resto de esquejes.

***4.3 ESTUDIO DEL CRECIMIENTO RADICAL Y PARTE AÉREA
EN DISTINTOS SUSTRATOS***

En la primera medida (60 días después del trasplante en los tubos), examinando el perfil completo (Figura 7A) y realizando un análisis de varianza (ANOVA) simple, comprobamos que no hay diferencias significativas ($F=0,121$ y $P=0,888$) entre los tres sustratos utilizados para el estudio y los valores de la longitud radical para el perfil completo son similares. Aunque no hay diferencias significativas, si hay tendencias a que las plantas de azufaifo alcancen algo de mayor longitud radical en S2 (mezcla) y S3(tierra) hasta valores que se situaron un 24,09 % y un 27,71 % por encima de los producidos en S1(turba), respectivamente.

En estos 60 primeros días, el crecimiento radical alcanzó una profundidad máxima de 90 cm en el sustrato S3, alcanzando el perfil de 60-90 cms., al igual que en el sustrato S2, aunque la longitud de las raíces fue algo menor, mientras que en el sustrato S1 el crecimiento fue menor aún, no alcanzando las raíces el perfil 45-60 cm. (Figuras 8A, 8B, 8C, 8D, 8E).

Según el análisis de varianza (ANOVA) simple, en los perfiles de 0-15 cm ($F=1,006$ y $P=0,403$), 15-30 cm ($F=1,543$ y $P=0,265$), 30-45 cm ($F=0,124$ y $P=0,885$), 45-60 cm ($F=0,269$ y $P=0,770$) y 60-90 cm ($F=0,900$ y $P=0,440$) el crecimiento radical resultó similar en los tres sustratos estudiados S1 (turba), S2 (turba-tierra p/v 1:1), S3 (tierra), y no hubo diferencias significativas entre ellos, por lo que el tipo de sustrato no afectó al crecimiento del sistema radicular en esta primera medición.

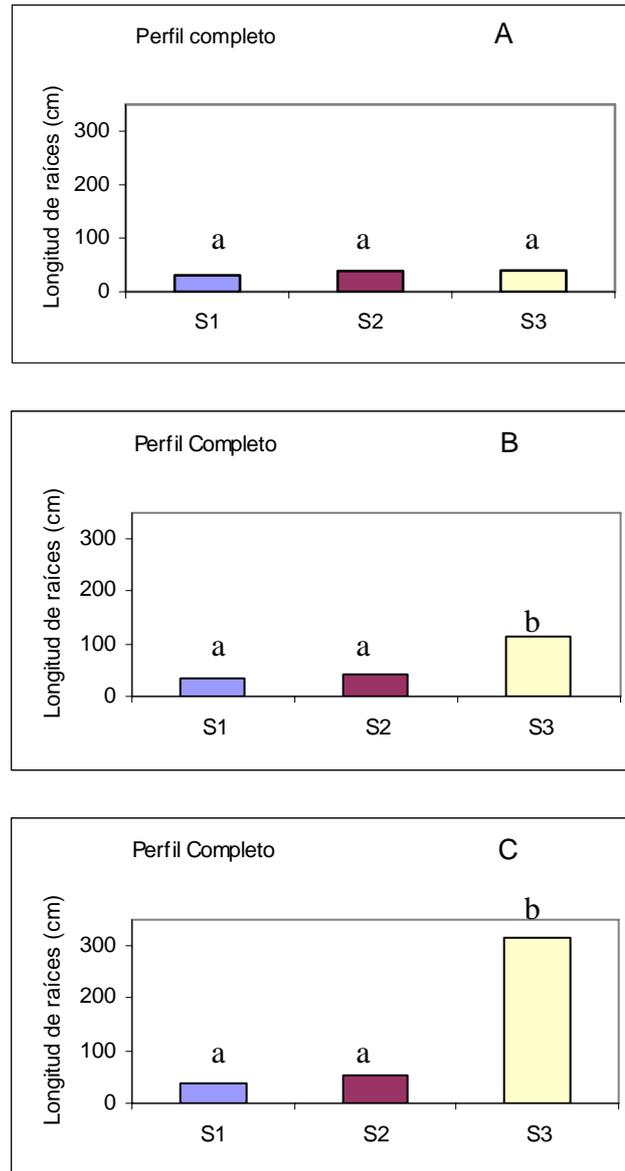


Figura 7. Medida de la longitud radical transcurridos 60 (A), 90 (B) y 120 (C) días desde el transplante en contenedores transparentes de 100 cm de longitud, realizadas en perfil completo de los tubos, en plantas de *Ziziphus lotus* cultivadas en condiciones de invernadero. Letras diferentes entre columnas indican diferencias significativas según la prueba de Tuckey para valores de probabilidad iguales o inferiores al 5 %.

En la segunda medida (90 días después del trasplante en los tubos), examinando el perfil completo (Figura 7B) y realizando un análisis de varianza (ANOVA) simple ($F=3,694$ y $P=0,067$), comprobamos que entre los sustratos S1 y S2, no hay diferencias significativas, y las raíces han ido desarrollándose de manera proporcional en los cinco perfiles examinados. Por el contrario, sí hay diferencias significativas entre los sustratos S1 y S2 con el sustrato S3 en el que las raíces alcanzaron un mayor desarrollo radicular, hasta valores que se situaron un 173,63 % y un 213,54 % por encima de los sustratos S1 y S2 respectivamente.

A los 90 días después del trasplante a los tubos, el crecimiento radical alcanzó la máxima profundidad en los tubos en los tres sustratos (Figuras 8F, 8G, 8H, 8I, 8J). Según el análisis de varianza (ANOVA) simple, en los perfiles de 0-15 cm ($F=0,7$ y $P=0,522$) y 15-30 cm ($F=2,354$ y $P=0,151$) el crecimiento radical resultó similar en los tres sustratos estudiados y no hubo diferencias significativas entre ellos, por lo que el tipo de sustrato no afectó al crecimiento del sistema radicular, principalmente debido a una suberización evidente de las raíces en estos perfiles y a una mayor intensidad de crecimiento hacia las zonas más profundas de los tubos.

Por el contrario, en los perfiles 30-45 cm ($F=4,234$ y $P=0,051$), 45-60 cm ($F=5,835$ y $P=0,024$) y 60-90 cm ($F=3,153$ y $P=0,092$) sí que se observan diferencias significativas de los sustratos S1 y S2, con respecto al sustrato S3 que ha alcanzado valores mucho más elevados en el desarrollo radicular, como se puede observar en la Figura 8.

En la tercera medida (120 días después del trasplante en los tubos), examinando el perfil completo (Figura 7C) y realizando un análisis de varianza (ANOVA) simple ($F=22,559$ y $P=0,000$), comprobamos que entre los sustratos S1 y S2, no hay diferencias significativas, y las raíces han ido desarrollándose de manera proporcional en los cinco perfiles examinados. Por el contrario, sí hay diferencias significativas entre los sustratos S1 y S2 con el sustrato S3 en el que las raíces alcanzaron un mayor desarrollo radicular, hasta valores que se situaron un 512,28 % y un 767,23 % por encima de los sustratos S1 y S2 respectivamente.

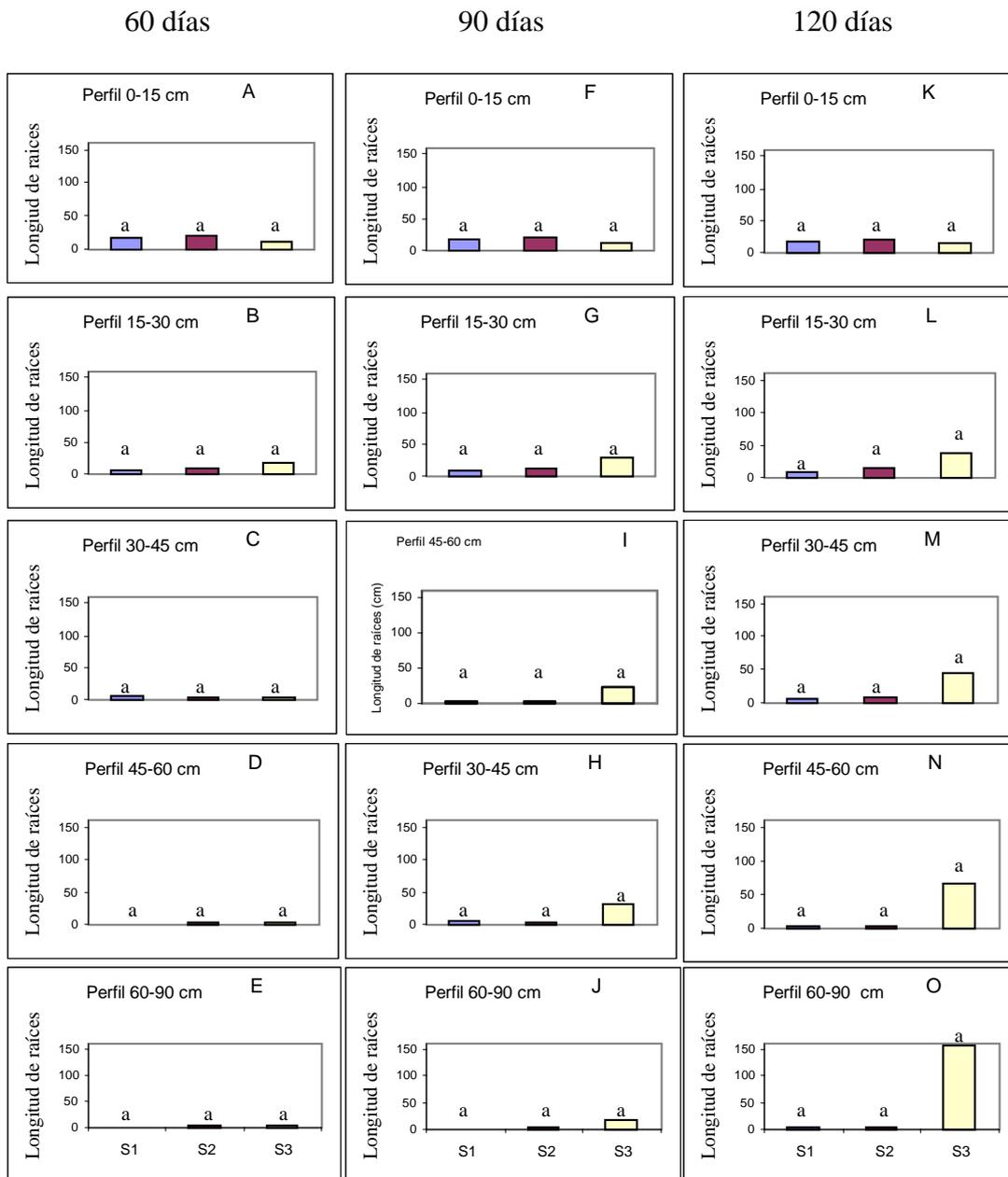


Figura 8. Medida de la longitud radical transcurridos 60 (A-E), 90 (F-J) y 120 (K-O) días desde el transplante en contenedores transparentes de 100 cm de longitud, realizadas en cinco perfiles (0-90 cm) en plantas de *Ziziphus lotus* cultivadas en condiciones de invernadero. Letras diferentes entre columnas indican diferencias significativas según la prueba de Tuckey para valores de probabilidad iguales o inferiores al 5 %.

En esta tercera medida (a los 120 días), el crecimiento radical alcanzó la máxima profundidad radicular en los tres sustratos ensayados (Figuras 8K, 8L, 8M, 8N, 8O). Según el análisis de varianza (ANOVA) simple, sólo en el perfil de 0-15 cm ($F=0,7$ y $P=0,522$) el crecimiento radical resultó similar en los tres sustratos y no hubo diferencias significativas entre ellos, principalmente debido a una suberización evidente de las raíces en este perfil y a una mayor intensidad de crecimiento hacia las zonas más profundas de los tubos, por lo que el tipo de sustrato no afectó al crecimiento del sistema radicular en dicho perfil.

Por el contrario, en los 5 perfiles siguiente, 15-30 cm ($F=3,479$ y $P=0,076$), 30-45 cm ($F=9,954$ y $P=0,005$), 45-60 cm ($F=37,449$ y $P=0,000$) y 60-90 cm ($F=45,410$ y $P=0,000$) sí que se observan diferencias significativas de los sustratos S1 y S2, con respecto al sustrato S3 que ha alcanzado valores mucho más elevados en el desarrollo radicular, como se observa en la Figura 8.

Este crecimiento tan elevado con el paso del tiempo, y sobre todo en los perfiles más profundos, no hace mas que corroborar que se trata de una planta muy adaptada a condiciones de sequía y aridez, y es capaz de crear un gran sistema radicular, pivotante en general, con escasas ramificaciones y muy finas, que permita a la planta alcanzar y buscar el agua (Foto 30 y 31).

La mayor capacidad de intercambio catiónico de la tierra frente a la turba puede ser la causa de que este sustrato favorezca el desarrollo radicular.

La influencia de las propiedades físicas sobre el crecimiento radical es un aspecto conocido (Pfleger, 1990; Ansorena, 1994; Abad, 1997; Burés, 1999; Ventrella *et al.*, 2002). Dentro de estas la estructura es unos de los principales factores que afectan al crecimiento radical, dado que interviene en el grado de resistencia al avance de las raíces (Yunusa *et al.*, 2002), debido a procesos de compactación (Siqueira y Pavan, 1997) y/o a las características propias del material utilizado como medio de crecimiento radical que en ocasiones puede ser excesivamente pesado (Biasi y DeBona, 2000). Las propiedades físicas y químicas de

un sustrato orgánico influyen sobre el desarrollo vegetal, y muy especialmente sobre el desarrollo radical (Bruckner y Roeber, 1997). Adicionalmente, sus propiedades físicas provocan una respuesta diferencial que repercute sobre el comportamiento de las plantas en condiciones de transplante a terreno definitivo (Pastor, 2000). La porosidad, la densidad aparente, la textura, etc., son algunas de las propiedades físicas que más pueden condicionar el crecimiento de las raíces, siendo todas ellas mejoradas cuando se incorpora alguna fuente de materia orgánica (Xiong y Liu, 1992; Wang *et al.*, 1997; Bruckner y Roeber, 1997). En nuestro caso vemos que se produce un mayor crecimiento radical en los sustratos que tienen menor cantidad de materia orgánica (tierra y mezcla), que en el sustrato en el que hay turba con mayor cantidad de materia orgánica. Por tanto, en nuestra experiencia con *Ziziphus lotus*, podríamos correlacionar un mayor crecimiento de las plantas en los sustratos con tierra debido a que estos sustratos tienen una menor porosidad de aireación y una elevada densidad aparente, por lo que se produce una reducción en el agua disponible y una elevada resistencia del suelo al crecimiento de las raíces, aspecto que observado con anterioridad por Cass *et al.* (1994), y dado que este tipo de planta, como dijimos anteriormente, está acostumbrada a desarrollarse en regiones de ambientes semiáridos o áridos, y sus raíces pueden alcanzar profundidades muy elevadas, pues la planta se nutre y busca agua por todos los perfiles del tubo, lo que hace que produzca un mayor desarrollo de su sistema radicular y aéreo, mientras que las plantas que se encuentran en los tubos con turba, al tener ésta una mayor capacidad de retención de agua, hace que la planta no desarrolle tanto su sistema radicular al tener el agua donde la necesita, mientras que por el contrario, en los tubos con tierra, debido a que la tierra retiene con más fuerza el agua, la planta buscará agua en cualquier sitio donde se encuentre del perfil, y sus raíces alcanzaran un gran desarrollo.



Foto 30. Detalle del sistema radicular a lo largo del tubo, en el que se puede apreciar una raíz muy larga y pivotante que llega al final del tubo, así como escasas ramificaciones laterales.



Foto 31. Sistema radicular con más detalle en el perfil del tubo, en el que se puede apreciar un grado de suberización en las zonas más altas, y pequeñas raicillas laterales de escasa consistencia.

Con respecto a la parte aérea de la planta, podemos observar que el crecimiento y desarrollo de la parte aérea depende del desarrollo radicular. Las plantas que han crecido en el sustrato S3 (tierra), han tenido un desarrollo mucho más grande que las que han crecido en S1(turba) o en S2 (mezcla), que apenas han tenido desarrollo de la parte aérea con respecto a cuando fueron transplantadas (Foto 32).

En la tabla 4 pueden observarse las principales diferencias en el desarrollo de la parte aérea de las plantas en el interior de los tubos. Todas las medidas son las medias de las plantas de los 4 tubos.

Sustrato	Altura (cm)	Ramificaciones	Nº hojas
Turba	2,4	0	7,4
Mezcla	5,2	2	23
Tierra	15,25	12	260

Tabla 4. Diferencias de la parte aérea de las plantas

Esto indica que los sustratos que contienen tierra son el mejor medio para el desarrollo tanto de las raíces como de la parte aérea. Puede ser que el bajo pH de la turba impida el correcto desarrollo de la planta (Foto 33).



Foto 32. Se puede observar el mayor crecimiento de las plantas cultivadas en tierra (a la derecha de la imagen) que las cultivadas en mezcla tierra:turba y en turba (izquierda y centro respectivamente).



Foto 33. Diferencia en el crecimiento de la parte aérea en relación con el sustrato. El tubo de la izquierda es de tierra, el del centro de mezcla 1:1 y el de la derecha de turba. Se aprecia un crecimiento mucho mayor en tierra que en turba, que apenas creció desde el trasplante.

5. CONCLUSIONES GENERALES

Las principales conclusiones obtenidas con los estudios de germinación son:

- En el ensayo de semillas sin hueso se alcanzaron los porcentajes más elevados de germinación de todos los ensayos estudiados (73 %), por lo que para que se obtenga una germinación rápida y elevada, hay que partir los huesos de *Ziziphus lotus*, de una manera mecánica y con precisión, ya que si no, las semillas al ir pegadas al hueso se romperían a la menor presión.
- Ensayando con el hueso del fruto a temperaturas controladas, el porcentaje de germinación más elevado se obtuvo a 30°C, aunque dicha germinación no superó el 10,5 %. No obstante en ensayos de invernadero, con esos mismos huesos se llegó a alcanzar un 19,04% de germinación.
- La escarificación térmica no ha eliminado la resistencia física del hueso, ya que no ha estimulado la germinación.
- La estratificación fría tampoco ha estimulado la germinación de las semillas con respecto a otros ensayos anteriores, ni en seco ni en húmedo, y ni siquiera la aplicación de ácido giberélico ha sido válida. Concluimos que el almacenamiento en frío no elimina tampoco el impedimento físico que supone el hueso para la germinación de las semillas.

Las principales conclusiones a las que se ha llegado tras la realización de los estudios de enraizamiento en el presente trabajo son:

Del estudio de la influencia de la posición del esqueje en la planta y del uso combinado de AIB para su enraizamiento realizado solamente en el primer ensayo, aunque ninguno presentó enraizamiento podemos concluir que los que mejor

respondieron a la hormona y los de más duración y brotación fueron los esquejes basales de mayor diámetro, por lo que en los posteriores ensayos, solo serían usados éstos, y para futuros ensayos de enraizamiento lo conveniente sería usar esquejes basales, que poseen un mayor número de reservas.

Del uso de diversas concentraciones de AIB cabe destacar que ninguna de las que se ha utilizado en los ensayos en invernadero ha dado resultados. Únicamente la concentración que ha sido capaz de formar callos de células en proceso de diferenciación fue la de 25 ppm de AIB aplicada durante 48 horas en la base del esqueje.

Por lo tanto, para posteriores estudios de enraizamiento de *Ziziphus lotus*, como punto de partida se podrían utilizar esquejes basales y concentraciones de 25 ppm durante 48 horas a unos 25°C.

Del estudio del crecimiento radical de plántulas del azufaifo procedentes de las bandejas de germinación en diversos medios/sustratos, podemos concluir que la utilización de sustratos de base mineral (tierra) ha sido el que mejor ha permitido desarrollar el crecimiento de las raíces hacia las capas más profundas en busca de agua, ya que esta planta está acostumbrada a zonas áridas o semiáridas, mientras que los sustratos de base orgánica, como la turba negra, al poseer una mayor capacidad de retención de agua en las capas superiores, hacen que la raíz se acostumbre a tener agua disponible siempre, lo que es perjudicial para el desarrollo de la planta, ya que necesita que las raíces alcancen profundidades elevadas. El bajo pH de la turba puede ser otra razón para explicar este hecho. Por tanto, el excelente crecimiento del sistema radical de esta especie en sustratos de tierra nos indica que éste es un buen sustrato para la producción de planta en vivero para llevar a cabo los trabajos de revegetación y repoblación de la especie.

6. BIBLIOGRAFÍA

6.BIBLIOGRAFÍA

- A. Tieu, K. W. Dixon, K. A. Meney y K. Sivasithamparam, 2001. The interaction of heat and smoke in the release of seed dormancy in seven species from Southwestern Australia. *Annals of Botany*, 88: 259-265.
- Abad, M. Noguera, P. Los sustratos en los cultivos sin suelo. pp. 101-150. En: Manual de cultivo sin suelo. Urrestarazu, M. Ed. Universidad de Almería.
- Alagesaboopathi, C. y Balu, S. 2000. Vegetative propagation of *Andrographis elongata* T. by stem cuttings. *Journal of Economic and Taxonomic Botany* 24(2): 409-412.
- Albrecht, A.; Angers, D. A.; Beare, H.M.; Blanchart, E. 1998. Organic and biological determinatives of agregation: implications for physical fertilyry recapitalization of tropical soils. *Cahiers Agricultures*, 5, 357-363.

- Al-Obeed, R.S. The effect of growth regulators, phenolic compounds and time of propagation on the rooting of guava stem cuttings. *Alexandria Journal of Agricultural Research*, 45: 189-199.
- Ansorena, J. 1994. Sustratos: Propiedades y caracterización. Mundi Prensa, Madrid, pp. 172.
- Arachchi, L.P.V.; Liyanage, M. 1996. Role of *Gliricidia sepium* on physical improvement of gravelly soil. *Cocos*, 11: 40-52.
- Azcón-Bieto, J. & Talón, M. 2000. Fundamentos de Fisiología Vegetal, Ed. McGrawHill: 435-451.
- Bañón, S.; Martínez-Sánchez, J.J.; Fernández, J.A.; González, A. y Ochoa, J. 2002. Effect of indolebutyric acid and paclobutrazol on the rooting of *Rhamnus alaternus* stem cuttings. *Acta Horticulturae* (en prensa).
- Baskin, J. and Baskin, C.C., 1979. The germination strategy of oldfield aster (*Aster pilosus*) *Am. J. Bot.* 66: 1-5.
- Baskin, J. and Baskin, C.C., 1979a Timing of seed germination in the weedy summer annual *Euphorbia supina* (*maculata*). *Bartonia*, 46: 63-68.
- Baskin, J. and C.C. Baskin, 1989. Role of temperature in regulating timing of germination in soil seed reserves of *Thlaspi arvense* L. *Weed Research*, 29: 317-326.
- Bathke, G.R.; Cassel, D.K.; Hargrove, W.L.; Porter, P.M. 1992. Modification of soil physical properties and root growth response. *Soil Science*, 154, 316-329.
- Bell D.T. 1999. The process of germination in Australian species. *Australian Journal of Botany* 47: 475-517.

- Besnier Romero, F., 1989. Semillas: biología y tecnología. Ed. Mundi-Prensa.
- Biasi, L.A. y De Bona, C.M. 2000. Cutting propagation of *Baccharis trimera* (Less.).
Revista Brasileira de Plantas Medicinai., 2: 37-43.
- Brascamp, W. 1991. Rooting of *Clerodendrum thomsoniae* cuttings as affected by paclobutrazol and rooting hormones. *Combined Proceedings International Plant Propagators Society* 40: 326-333.
- Brenchley, J.L., Probert, R.J., 1998. Seed germination responses to some environmental factors in the sea grass *Zostera capricorni* from eastern Australia. *Aquat. Bot.* 62: 177-188.
- Brown, D.A.; Scott, A. 1984. Dependence of crop growth and yield on root development and activity. En: *Roots, Nutrient and water influx, and Plant Growth* (Barber, S.A. y Bouldin, D.R. Eds.). ASA Special Publication n°48, American Society of Agronomy, Madison, Wisconsin, 101-136.
- Brown, D.A.; Upchurch, D.R. 1987. Minirhizotrons: A summary of methods and instruments in current use. En: *Minirhizotron Observation Tubes: Methods and Applications for Measuring Rhizosphere Dynamics* (Taylor, H.M., Ed.). American Society of Agronomy Special Publication n°50, Madison, Wisconsin, 15-30
- Bruckner, U.; Roeber, R. U. 1997. Physical properties of different potting media and substrate mixtures, especially air and water capacity. International symposium on growing media and plant nutrition in horticulture, Freising, Germany. *Acta Horticulturae* n° 450, 263-270.
- Burés, S. 1999. Introducción a los sustratos: aspectos generales. pp. 19-46. Tecnología de sustratos. Aplicación a la producción viverística ornamental, hortícola y forestal. Pastor, J.N. Ed. Universidad de Lérida.

- Caballero, M.; Jiménez, R.(1994). Plantas en maceta, un sector que sigue de actualidad. *Horticultura internacional*. Volumen 3: 68-69.
- Carolyn Howes Keiffer and Irwin A. Ungar, 1997. The effect of extended exposure to hypersaline conditions on the germination of five inland halophyte species. *American Journal of Botany*, 84 (1): 104-111.
- Cass, A.; Gusly, S.; McLeod, D.A.1994. Sustainability of soil structure quality in rice paddy-soya- bean cropping systems in south sulawesi, Indonesia. *Soil and Tillage Research*, 31: 339-352.
- Catalán Bachiller, G. 1991. *Semillas de árboles y arbustos forestales*. Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación. Colección Técnica. Instituto para la conservación de la Naturaleza. Madrid.
- Cheng, W.; Coleman, D.C.; Box, J.E,Jr.(1991). Measuring root turnover using the minirhizotron technique. *Agriculture, Ecosystems and Enviroment*, 34, 261-267.
- Cipollini M.L. and D.J. Levey, 1997. Secondary metabolites of fleshy vertebratedispersed fruits: adaptive hypotheses and implications for seed dispersal. *American Naturalist* 150: 346-372.
- Copes, D.L. y Mandel, N.L. 2000. Effects of IBA and NAA treatments on rooting Douglas fir stem cuttings. *New Forests*, 20: 249-257.
- Debussche, M., Lepart, J., 1994. Establishment of woody plants in Mediterranean oldfields: opportunity in space and time. *Landscape Ecology* 6: 133-145.
- Denise Cunha F. S. Dias, 2005. Dormancia en semillas. Tema central Revista Seed News, año IX, n.4.

- Deschamps, C.; Boeing, C.; Scheffer, M.C. y Donj Filho L. 1999. Influence of dipping time in water and of growth regulators on the guaco (*Mikania glomerata* Spreng.) vegetative propagation. *Acta Horticulturae* 502: 113-116.
- Drew, M.C.(1988). Effects of flooding and oxigen deficiency and plant mineral nutrition. *Advances in plant nutrition*, 3, 115-159.
- Dwyer, L.M.; Stewart, D.W.; Balchin, D.(1998). Rooting characteristics of corn, soybeans and barley as a function of available water and soil physical charactyeristics. *CanadianJournal ofSoil Science*, 68, 121-132.
- Ehlers, W.; Hamblin, A.P.; Tennant, D.; Van Der Ploeg, R.R.(1991). Root system parametres determining water uptake of field crops. *Irrigation Science*, 12, 115-124.
- Fenner, M. 1985. Seed ecology, Chapman and Hall, New York..
- Fernández, J.E.; Moreno, F.; Martin-Aranda, J.; Fereres, E. 1992. Olive-tree root dynamics under different soil water regimes. *Agricultura Mediterránea*, 122, 225-235.
- Figueroa J, J. Armesto y J.F. Hernández, 1996. Estrategias de germinación y latencia de semillas en especies del bosque templado de Chiloé, Chile. *Revista Chilena de Historia Natural*, 69: 260-299.
- Fowkes, N.D.; Landsberg, J.J. 1981. Optimal roots systems in terms of water uptake and movement. En: *Mathematics and Plant Physiology*. Academic Press, London, 109-125.
- Franco, J.A.; Abrisqueta, J.M. 1997. A comparison between minirhizotron and soil coiring methods of stimating root distribution in young almond trees under trickle irrigation. *Jorunal of Horticultural Science*, 72: 797-805.

- Franco, J.A.; Bañón, S.; Fernández, J.A.; Leskovar, D.I. 2001. Effect of nursery regimes and stablishment irrigation on root development of *Lotus creticus* seedlings following transplanting. *Journal of Horticultural Science and Biotechnology*, 76: 174-179.
- Franco, J.A.; Cros, V.; Bañón, S.; González, A.; Abrisqueta, J.M. 2002. Effects of nursery irrigation on posttrasplanting dynamics of *Lotus creticus* in semiarid field conditions. *HortScience*, 37: 525-528.
- Freas, K.E. & Kempt, P.R., 1983. Some relationships between environmental reliability and seed dormancy in desert annual plants. *Journal of Ecology* 71: 211-217.
- Garrido, G.; Cano, E.A.; Acosta, M. y Sánchez Bravo, J. 1998. Formation and growth of roots in carnation cuttings: influence of cold storage period and auxin treatment. *Scientia Horticulturae* 74(3): 219-231.
- Giulivo, C.(1990). Interazioni tra nutrizione minerale e estado idrico della pianta e del terreno. *Rivista di frutticoltura*, 52 (4), 9-18.
- Greenwood, D.J.; Gerwitz, A.; Stone, D.A.; Barnes, A. 1982. Root development of vegetable crops. *Plant and soil*, 30, 205-214.
- Guehl, J.M.; Falconnet, G.; Gruez. J. 1989. Phisiological characteristcs and field survival of *Cedrus atlantica* seedlings raised in containers on various tyopes of sustrate. *Annales des Sciences Forestieres*, 46: 1-14.
- Gupta, V.K.; Kumar, R.V.; Datta, A. y Solanki, K.R. 1997. Vegetative propagation in *Anogeissus pendula*. *Range Management and Agroforestry*, 18: 85-90.
- Hartmann, H.T. ; Kester, D.E. ; Davies, Jr., F.T. 1990. Plant propagation. Principles and practices. Fifth Ed Prentice Hall International Editions, New Jersey.

- Hautala, H., Toluanen, A. & Nuortila, C., 2001. Regeneration strategies of dominant boreal forest dwarf shrubs in response to selective removal of understorey layers. *Journal of Vegetation Science* 12: 503-510.
- Hughes, K.A.; Wilde, R.H.(1988). Rooty distributions and their interactions with the soil. *Proceedings of the Agronomy Society of New Zealand*, 18, 33-36.
- Jarvis, B.C. 1986. Endogenous control of adventitious rooting in non-woody cuttings. In: MB Jackson, ed. *New Root Formation in Plants and Cuttings*, 191-222.
- Javier A. Figueroa y Fabian M. Jaksic, 2004. Latencia y banco de semillas en plantas de la región mediterránea de Chile central. *Revista Chilena de Historia Natural*, v.77: 201-215.
- Keeley J.E. & C.J. Fotheringham, 1997. Trace gas emissions and smoke-induced seed germination. *Science* 276: 1248-1250.
- Khabou, W. y Drira, N. 2000. Variation in the rooting of leafy stem cuttings of olive varieties and clones (*Olea europea L.*) cultivated in Tunisia. *Olivae*, 84: 47-49.
- Kivilaan, A. & Badurski, R.S., 1981. The one hundred-year period of Dr. Beal's seed viability experiment. *American Journal of Botany*, 68: 1290-1291.
- Klein, J.D., Cohen, S. y Hebbe, I. 2000. Seasonal variation on rooting ability of myrtle (*Myrtus communis L.*) cuttings. *Scientia Horticulturae* 83: 71-76.
- Kralik, J.; Rauscherova, L. and Sebánek, J. 1989. The effect of Cytar and indolebutyric acid on the rooting of myrobalan (*Prunus cerasifera Ehrh.*) cuttings. *Acta Universitatis Agriculturae* 4(1): 3-11.

- Lee, A. y Suh, J.K. 1997. Effect of media, plant growth regulators and hot water treatment on rooting of stem and root cuttings in *Ardisia spp.* *Journal of Korean Society for Horticultural Science*, 38: 546-550.
- Levan, M.A.; Ycas, J.C.; Hummel, J.W. 1987. Light leak effects on near-surface soybean rooting observed with minirhizotrons. En: *Minirhizotron Observation Tubes: Methods and Applications for Measuring Rhizosphere Dynamics* (Taylor, H.M., Ed.). American Society of Agronomy Special Publication n°50, Madison, Wisconsin, 89-98.
- Longsdon, S.L.; Parker, J.C.; Reneau, R.B.Jr. 1987. Root growth as influenced by aggregate size. *Plant and Soil*, 99, 267-275.
- Manzoor, A.; Sabir, M.S.; Aslam, M. 1992. Effect of soil compaction and organic matter on growth of wheat crop. *Pakistan Science*, 7(1-2): 39-41.
- McMichael, B.L.; Taylor, H.M. 1987. Applications and limitations of rhizotrons and minirhizotrons. En: *Minirhizotron Observation Tubes: Methods and Applications for Measuring Rhizosphere Dynamics* (Taylor, H.M., Ed). American Society of Agronomy Special Publication n°50, Madison, Wisconsin, 1-13.
- Meyer, W.S.; Barrs, H.D. 1991. Roots in irrigated clay soils: Measurement Techniques and responses to rootzone conditions. *Irrigation Science*, 12, 125-134.
- Mohamed-Yasseen Y., S.A. Barringer, W.E. Splittstoesser & S. Costanza, 1994. The role of seed coats in seed viability. *Botanical Review* 60: 426-439.
- Muñoz M.R. & E.R. Fuentes, 1989. Does fire induce shrub germination in the Chilean matorral? *Oikos* 56: 177-181.

- Naveh, Z. 1987. Landscape ecology management and conservation of european and levant mediterranean uplands. In: Plant response to stress. Functional analysis in mediterranean ecosystems (Tenhuenn J.D. Ed.). NATO ASI. Series ecological sciences, vol 15, Verlag, Berlin.
- Nordstróm, A.C. y Eliasson, L. 1984. Regulation of root formation by auxin-ethylene interaction in pea stem cuttings. *Physiol. Plant.* 61: 298-302.
- Ochoa, J. 2002. Optimización de la producción viverística de *Nerium oleander* L. Tesis doctoral. Universidad Politécnica de Cartagena. 275.
- Ochoa, J.; Bañón, S.; Franco, J.A.; Peñapareja, D.; Conesa, E.; Martínez-Sánchez, J. 2003. Enraizamiento de *Helichrysum stoechas* (L.) Moench con ácido indolbutírico. X Congreso Nacional de Ciencia Hortícolas de la SECH. Actas de Horticultura 39: 525-526.
- Pagliai, M.; Vignozzi, N. Jones, R. 2002. The soil pore system as an indicator of soil quality. *Advances in Geocology*, 35: 71-82.
- Paul, T.M. y Jhon, A.Q. 1993. Effect of etiolation and indolebutyric acid on rooting of Chinese privet (*Ligustrum lucidum*) cuttings. *Advances in Plant Sciences*, 6: 351-354.
- Peñapareja, D. ; 2003. Reproducción por esquejes y crecimiento radical de *Helichrysum stoechas* (L.) Moench . Universidad Politécnica de Cartagena. 6-8.
- Pérez García, F.; Pita Villamil, M.J. & Gómez Campo, C. 1.993. Fisiología de Semillas. E.T.S. Ingenieros Agrónomos. Universidad Politécnica de Madrid
- Pfleger, I. 1990. Model experiments on root growth of some crop species. *Archiv fur Acker und Pflanzbau und Bodenkunde*, 34: 155-163.

- Philippi, T., 1993. Bet hedging germination of desert annuals: beyond the first year. *American Naturalist*, 142: 474-487.
- Piccioni, E.; Langari, F.; Standardj, A. y Ciribuco, S. 1996. Propagation by cuttings and containerized production of several woody species. *Informatore Agrario*, 52: 87-91.
- Pujol, J.A., Calvo, F. & Ramírez-Díaz, L., 2001. Seed germination, growth, and osmotic adjustment in response to NaCl in a rare succulent halophyte from southeastern Spain. *Wetlands*, 21: 256-264.
- Rey, J., Espigares, T., Nicolau, J.M., 2003. *Restauración de ecosistemas Mediterráneos*. Asociación Española de Ecología Terrestre. Colección Aula Abierta 20: 87-112.
- Sánchez-Blanco, M.J.; Morales, M.A.; Torrecillas, A.; Alarcón, J.J. 1998. Diurnal and seasonal osmotic potential changes in *Lotus creticus* creticus plants grown under saline stress. *Plant Science*, 136: 1-10.
- Sato, Y. y Hosoe, Y. 1998. Propagation of the pear rootstocks (*Pyrus betuleafolia* Bunge) by leafing stem cutting. *Journal of the Faculty of Agriculture, Shinshu*, 35(1): 19-24.
- Scott, R.(1997). *Plant Root Systems: Their function and interaction with the soil*. McGraw-Hill, London.
- Shen-Miller, J., Mudgett, M.B., Schopf, J.W., Clarke, S. & Berger, R., 1995. Exceptional seed longevity and robust growth: ancient sacred lotus from China. *American journal of Botany*, 82: 1367-1380.

- Singh, S.N.; Minhas, P.P.S. y Sandhu, A.S. 1993. Influence of indole butyric acid on rootng of stem cuttings of plum cv. Kabul Green Gage. Punjab Horticultural Journal, 33: 63-64.
- Siqueira, R.; Pavan, M.A. 1997. Coffe root growth in compacted layers of an acid soil with an d without chemical restrictions. Arquivos de biología e tecnología, 40: 1-8.
- Smucker, A.J.M.; Aiken, R.M. 1992. Dynamic root responses to water deficits. Soil Science, 154, 281-289.
- Stumpf, E.R.T.; Grolli, P.R. y da Silva, J.A.G. 1999. Rooting of *Chamaecyparis lawsoniana* Parl. Cuttings with indolebutyric acid in five media. Ciencia Rural, 29: 207-211.
- Sultan, S.M.; Saleem, M.D. y Al Atrakchi, A.O. 1990. Propagation of *Wisteria floribunda* by hardwood cuttings. Mesopotamia Journal of Agriculture 22(4): 53-62
- Taylor, H.M.; Bóhm, W. 1976. Use of acrylic plastic as a rhizotron windows. Agronomy Journal, 68, 693-694.
- Ungar, I. A., 1978. Halophyte seed germination. Bot. Rev. 44: 233-264.
- Ungar, I. A., 1982. Germination ecology of halophytes. Tasks for vegetation science. Vol. 2. Edited by D. N. Sen and K. S. Rajpurohit. Dr. W. Junk Publishers, Dordrecht, Netherlands. Pp. 143-154.
- Ungar, I. A., 1987. Population ecology of the halophyte seeds. Bot. Rev. 53: 301-334.
- Ungar, LA., 1996. Effect of salinity on seed germination, growth, and ion accumulation of *Atriplex patula* (Chenopodiaceae). American .Journal of Botany 83: 601-607.

- Van Staden J, Nac Brown, A.K. Jager & T.A. Johnson, 2000. Smoke as a germination cue. *Plant Species Biology* 15: 167-178.
- Vázquez-Yanes C. & A. Orozco-Segovia, 1998. Physiological ecology of Mediterranean seeds: link with Ex Situ conservation of plants. En: Rundel PW, G
- Ventrella, D.; Castrignano, A.; Maiorana, M.; Losavio, N.; Vonella, A. V.; Fornaro, F.; Pagliai, M.; Jones, R. 2002. Irrigation with brackish water: effects on soil strength of a fine-textured soil. *Advances in Geoeocology* n°35, 279-290.
- Vergniaud, P. 1992. Les plantes couvre en région méditerranéenne. *PHM Revue Horticole*, 333, 23-26.
- Voorhees, W.B. 1976. Root elongation along a soil-plastic container interface. *Agronomy Journal*, 68, 143.
- Wang, D.S.; Shu, H.R.; Gu, M.R. 1997. Influences of soil physical and chemical factors on the growth of root system of apple trees. *Journal of Fruit Science*, 14: 110-112.
- Weber Blaschke, G.; Claus, M.; Rehfuss, K.E. 2002. Growth and nutrition of ash (*Fraxinus excelsior* L.) and sycamore (*Acer pseudoplatanus* L.) on soils of different base saturation in pot experiments. *Forest Ecology and Management*, 167: 1-3, 43-56.
- Westwood, M.N. 1982. *Fruticultura en zonas templadas*. Ed. Mundi-Prensa, Madrid.
- Wiesman, Z. y Lavee, S. 1995. Enhancement of AIB stimulatory effect on rooting of olive cultivar stem cuttings. *Scientia Horticulturae* 62: 189-198.
- Wild, A. 1992. *Condiciones del suelo y desarrollo de las plantas según Russell*. Ed. Mundi-Prensa, Madrid, 4, 123-167.

Xiong, D.Z.; Liu, S.X. 1992. The effect of combined application of organic and inorganic fertilizers in arid red soil. *Journal of Fujian Agricultural College*, 21: 190-193.

Yokoishi, T., & S. Tanimoto, 1994. Seed germination of the halophyte *Suaeda japonica* under salt stress. *Journal of Plant Research*, 107: 385-388.

Yunusa, I.A.M.; Mele, P.M.; Rab, M.A. Schefe, C.R.; Beverly, C.R. 2002. Priming of soil structural and hidrological properties by native woody species, anual crops, and a permanent pasture. *Australian Journal of Soil Research*, 40: 207219.

Zobel, R.W. 1991. Root growth and development. En: *Rhizosphere and Plant Growth* (Keister, D.L. and Kregan, P.E. Eds.). Kluwer Academic Pub, Dordrecht, the Netherlands, 61-71.

www.carm.es/cma/dgmn/REVISTA/noviem04/html/azufaifo.htm

www.imurcia.net/flora/dicotiledoneas3.html

www.aeet.org/ecosistemas/032/articulo4.htm

www.naturayeducacion.com/plantas/info_plantas.asp?clave=62

www.floraguide.es/arboles

www.euita.upv.es/varios/biologia/Temas/tema_17.htm

