



Universidad de Valladolid
Campus de Palencia

**ESCUELA TÉCNICA SUPERIOR
DE INGENIERÍAS AGRARIAS**

Grado en Ingeniería Agrícola y del Medio Rural

Mejora del crecimiento en trigo blando y cebada mediante técnicas de estimulación de semilla (*seed priming*): radiación uv, exposición a ozono y pretratamiento con micronutrientes (*nutripriming*).

Alumno: Álvaro Iglesias Ganado

Tutor: Oscar Santamaría Becerril

Cotutor: Jorge Poveda Arias

Diciembre de 2023



Copia para el tutor/a

ÍNDICE

1. RESUMEN	3
2. INTRODUCCIÓN	5
2.1 SITUACIÓN ACTUAL	5
2.2 IMPORTANCIA Y SITUACIÓN DEL CULTIVO DE TRIGO Y CEBADA EN ESPAÑA Y CASTILLA Y LEÓN	6
2.3 POSIBLES ESTRATEGIAS AGRÍCOLAS ANTE LA SITUACIÓN PLANTEADA	10
2.4 <i>SEED PRIMING</i>	11
2.5 <i>SEED PRIMING</i> CON UV	13
2.6 <i>SEED PRIMING</i> CON OZONO	15
2.7 <i>NUTRIPRIMING</i>	16
3. OBJETIVOS	19
4. MATERIAL Y MÉTODOS	20
4.1 MATERIAL VEGETAL	20
4.2 TRATAMIENTOS	20
4.2.1 TRATAMIENTOS UV	20
4.2.2 TRATAMIENTOS OZONO	22
4.2.3 TRATAMIENTOS <i>NUTRIPRIMING</i>	23
4.3 PRUEBAS DE GERMINACIÓN EN PLACA	25
4.3.1 OZONO Y UV	25
4.3.2 <i>NUTRIPRIMING</i>	27
4.4 PRUEBA CRECIMIENTO EN BANDEJA DE ALVEOLOS	27
4.4.1 OZONO Y UV	27
4.4.2 <i>NUTRIPRIMING</i>	30
4.5. ANÁLISIS DE CONCENTRACIÓN DE MICRONUTRIENTES EN SEMILLA ..	31
4.6 ANÁLISIS ESTADÍSTICO	31
5. RESULTADOS	33
5.1 <i>PRIMING</i> CON UV Y/O OZONO	33
5.1.1 ANÁLISIS GERMINACIÓN EN PLACA PETRI	33
5.1.2 ANÁLISIS DEL CRECIMIENTO EN PLACA PETRI	35

5.1.3 ANÁLISIS DEL CRECIMIENTO EN BANDEJA DE ALVEOLOS.....	39
5.2 <i>NUTRIPRIMING</i>	43
5.2.1 ANÁLISIS DE GERMINACIÓN EN PLACA PETRI	43
5.2.1 ANÁLISIS DE CRECIMIENTO EN PLACA PETRI.....	44
5.2.2 ANÁLISIS DE CRECIMIENTO EN BANDEJA DE ALVEOLOS	47
5.2.3 ANÁLISIS DE MICRONUTRIENTES EN SEMILLA.....	54
6. DISCUSIÓN.....	55
6.1 UV Y/O OZONO	55
6.2 <i>NUTRIPRIMING</i>	58
7. CONCLUSIONES.....	62
8. BIBLIOGRAFÍA.....	63

1. RESUMEN

Ante el crecimiento exponencial de la población mundial, las restricciones en las tierras cultivables, el cambio climático y las nuevas regulaciones que limitan el uso de insumos, surge la necesidad de explorar alternativas sostenibles para mejorar la capacidad productiva de los cultivos. Este estudio contribuye a la búsqueda de soluciones innovadoras que puedan hacer frente a estos desafíos, promoviendo prácticas agrícolas más eficientes y respetuosas con el medio ambiente.

Dentro de estas soluciones encontramos el *priming* o estimulación de semillas que es un técnica prometedora y barata para poder mejorar la capacidad productiva de los cultivos. En la actualidad, existe un gran número de técnicas de *priming*. En esta investigación se evaluó la respuesta en semillas de trigo blando y cebada de dos carreras a la aplicación de estimulación mediante radiación UV y/u ozono a bajas dosis, así como tras la utilización de *nutripriming*, técnica consistente en sumergir las semillas en diferentes soluciones de nutrientes, en este caso boro, zinc y hierro.

En todas las técnicas estudiadas, se llevó a cabo inicialmente un ensayo de crecimiento en placa (*in vitro*), seguido de un ensayo en bandejas de alveolos para evaluar el impacto de los tratamientos en diversos parámetros biométricos. En el caso del *nutripriming*, se realizó un ensayo adicional en condiciones de riego deficitario, con el objetivo de evaluar su eficacia en condiciones de estrés hídrico.

En el análisis de las técnicas *priming* utilizando UV y ozono, se observaron mejoras significativas en la longitud de radícula por ambas técnicas en el ensayo en placa para ambos cultivos. Sin embargo, estos resultados positivos no se reflejaron de manera consistente en el ensayo en bandeja. En cuanto al *nutripriming* se identificaron mejoras significativas en la longitud de plúmula en la cebada para los tres nutrientes bajo condiciones de capacidad de campo. Estas mejoras no se observaron en condiciones de estrés hídrico en cebada, ni en el trigo bajo ninguna de las dos condiciones estudiadas.

Aunque las técnicas utilizadas no han demostrado ser completamente efectivas, los resultados positivos obtenidos, respaldados por investigaciones previas, revelan un cierto potencial que justifica una investigación más amplia en futuros experimentos. Este análisis podría incluir la evaluación de diversas variedades o incluso la aplicación a otros cultivos.

2. INTRODUCCIÓN

2.1 SITUACIÓN ACTUAL

Se estima que para el año 2050, la población mundial llegará a 9000 millones de personas (ONU, 2022). Esto significa que aumentará en 1000 millones respecto a los números actuales (Worldometer, 2023). Este incremento de la población, unido a un aumento del nivel de vida de países en vías de desarrollo, provocará un aumento de las necesidades alimentarias de entre un 35 y un 56% (Van Dijk et al, 2021). Las tierras cultivables del planeta son limitadas, de las cuales prácticamente todas están actualmente en producción, por lo que la solución para alimentar a la población futura debe proceder de una intensificación progresiva y sostenible de la agricultura (FAO 2023).

Además del crecimiento de la población, hay otro factor preocupante: el cambio climático. Este fenómeno provoca grandes pérdidas de cosechas, debido, principalmente a las sequías. Estas sequías no solo ocurren a nivel local, como ocurría en el pasado, sino a nivel mundial. Esto significa que, aunque vivamos en un mundo globalizado en el que una región con mala cosecha puede comprar alimentos a otra región, si las malas cosechas son mundiales o en áreas muy extensas, se generará un gran déficit de alimentos ese año (IPCC, 2022).

Junto a los problemas demográficos y climáticos, también existen desafíos de índole política, tanto a nivel comunitario como nacional. A nivel europeo, el Pacto Verde (Green Deal), y en concreto la estrategia “De la Granja a la Mesa” establecen una reducción de un 50% en el uso de productos fitosanitarios y un 25% de los fertilizantes químicos de síntesis (Farm to Fork Strategy, 2020). Esto, añadido a la continua prohibición de materias activas (EFSA 2023), hace cada vez más difícil el control de plagas, enfermedades y malas hierbas que reducen las producciones.

Con respecto a la fertilización, en España, cada vez hay más "Zonas Vulnerables a la Contaminación por Nitrógeno de Origen Agrario" (MAPA, 2022), lo que ha obligado a una reducción de la fertilización nitrogenada en estas áreas. Esta medida ha ocasionado, en muchos casos, una disminución en la producción, debido a la falta de aplicación de las unidades de nitrógeno necesarias para satisfacer las demandas del cultivo.

En vista de todos estos desafíos, es fundamental encontrar nuevas fórmulas que permitan incrementar o, por lo menos, mantener las cosechas en este nuevo marco legislativo, climático y demográfico, especialmente en cultivos clave por su importancia en la alimentación. Dentro de estos cultivos, destacan, especialmente en Castilla y León, y también en España el trigo y la cebada

2.2 IMPORTANCIA Y SITUACIÓN DEL CULTIVO DE TRIGO Y CEBADA EN ESPAÑA Y CASTILLA Y LEÓN

En el año 2022, en España se sembraron 1.903.557 ha de trigo blando, de las cuales un 10 % fueron en regadío y un 90% en secano. En cuanto a la cebada, para el mismo año, se sembraron 2.533.410 ha de las cuales un 9,6% fueron regadío y un 90,4% secano. Por lo tanto, entre los dos cultivos representan más del 26% de la superficie agrícola nacional (MAPA 2022).

Además, España es un país deficitario en la producción de trigo y cebada. En el caso del trigo, la balanza comercial, es decir, la diferencia entre importaciones y exportaciones fue negativa en 3.676.000 toneladas en el año 2021. En cuanto a la cebada, la balanza comercial fue negativa en 233.000 toneladas. Estos datos representan una pérdida económica significativa y, lo que es más importante, demuestran una dependencia de terceros países. (MICT, 2021).

Para poder explicar mejor la situación actual, es necesario centrarse en una región concreta, ya que en España contamos con diversas regiones agrarias, muy diferentes entre ellas. Con respecto a Castilla y León, esta región es referente nacional en la producción de cereales, representando el 45% de la producción nacional de trigo y el 31% de cebada. Estos cereales se cultivan principalmente en secano, por lo que la producción es dependiente de las condiciones agroclimáticas de cada año, principalmente de las lluvias de primavera (JCYL, 2022).

En esta región, se observan años con notables reducciones en la producción (Figuras 1.1 y 1.2). Estas malas cosechas son consecuencia de la escasez de lluvias durante la primavera, lo que provoca un significativo estrés hídrico en los cultivos de trigo y cebada.

Este déficit de precipitaciones tiene un impacto negativo en el potencial productivo de las plantas, llegando incluso al punto en que en algunas parcelas resulta poco rentable económicamente llevar a cabo la cosecha para los agricultores.

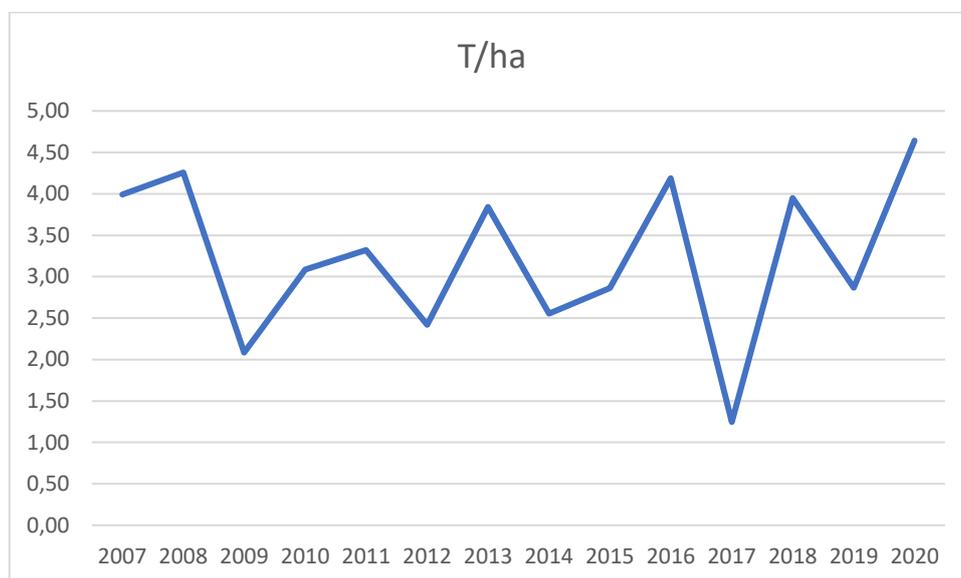


Figura 1.1: evolución de la producción de cebada en Castilla y León (Anuario Estadística Agraria JCYL, 2021).

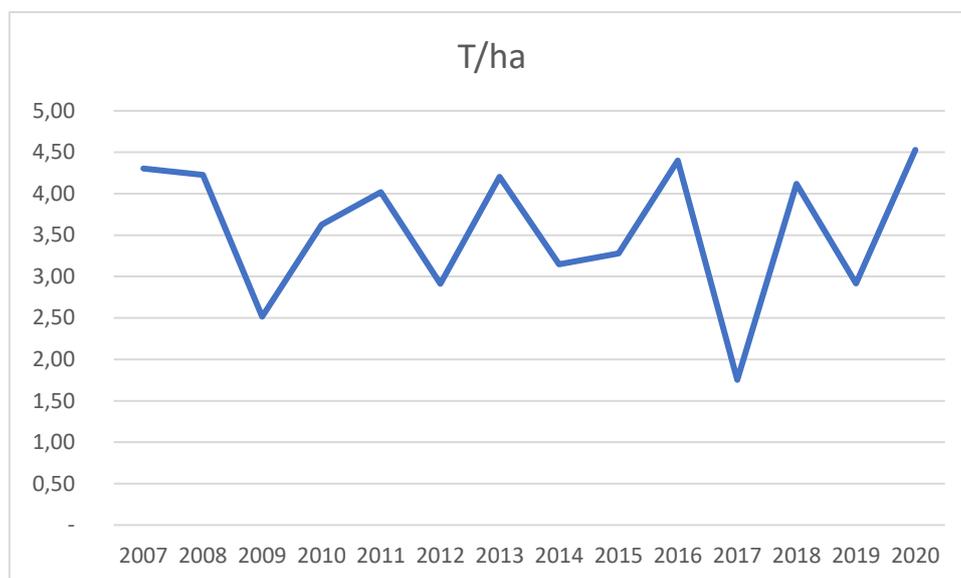


Figura 1.2: evolución de la producción de trigo en Castilla y León (Anuario de Estadística Agraria JCYL, 2021).

En cuanto a la extensión de tierras de cultivo, es notable que en Castilla y León, a pesar de enfrentar estas dificultades, la superficie destinada al cultivo de trigo y cebada no ha sufrido muchas variaciones (figuras 1.3 y 1.4). En el caso del trigo, se ha observado un aumento en la superficie cultivada, mientras que en el caso de la cebada, se ha registrado una disminución. Sin embargo, la suma total de ambas áreas de cultivo se ha mantenido constante en el período analizado.

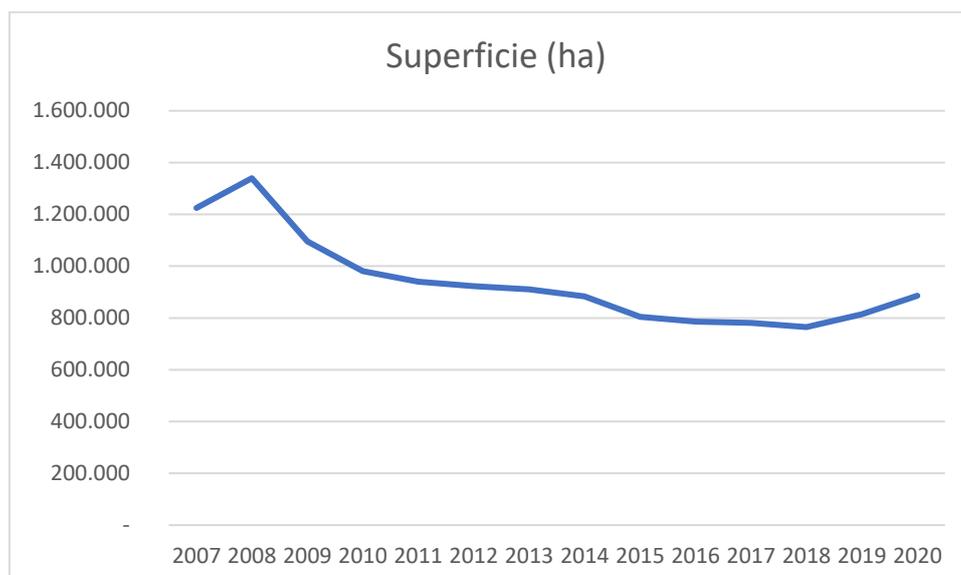


Figura 1.3: evolución de la superficie de cebada en Castilla y León (Anuario de estadística agraria JCYL, 2021).

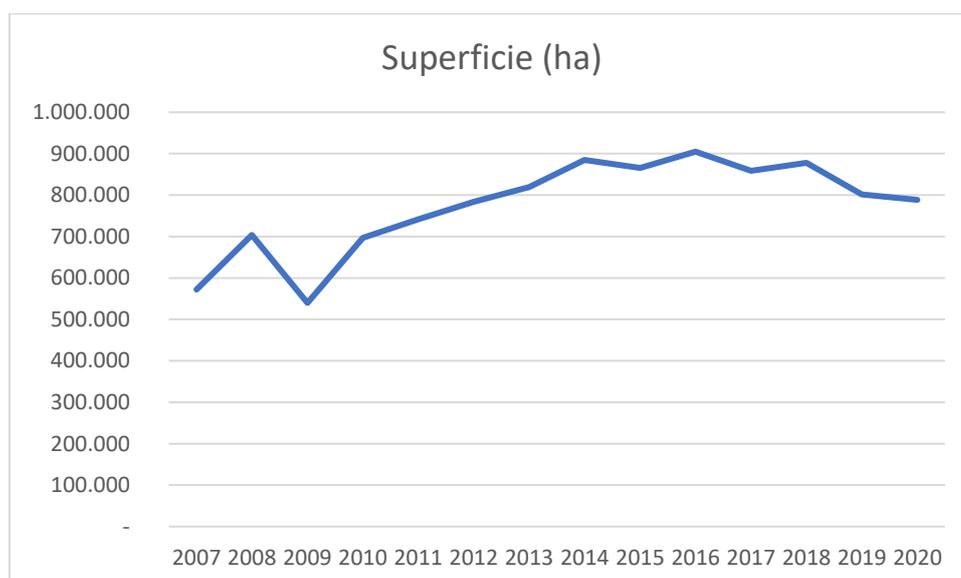


Figura 1.4: evolución de la superficie de trigo en Castilla y León (Anuario de estadística agraria JCYL, 2021).

2.3 POSIBLES ESTRATEGIAS AGRÍCOLAS ANTE LA SITUACIÓN PLANTEADA

Una vez analizados en los puntos anteriores, tanto la importancia del cultivo de trigo y cebada en Castilla y León y España, así como la problemática a la que se enfrenta su producción, cabe realizar un estudio sobre las posibles opciones disponibles para intentar solventar, o al menos minimizar, los impactos derivados de estas circunstancias. Presentamos aquí las más representativas:

- Aumentar las zonas de regadío. En el caso de los cereales de invierno, en Castilla y León se ha observado que la producción casi se duplica al aplicar riego (JCyL, 2021). Sin embargo, esta opción plantea una serie de problemas, ya que requeriría la expansión de las comunidades de regantes y el incremento de la capacidad de almacenamiento de agua en las cuencas hidrográficas. Además, esta medida conlleva un importante impacto ambiental que, debido a las restricciones establecidas por las normativas europeas, resulta complicada implementar en la actualidad. Además, representa un desafío económico considerable para las autoridades competentes.
- Mejorar las prácticas culturales por parte de los agricultores, junto con la implementación de avances tecnológicos en los insumos que utilizan. Los agricultores no siempre poseen los conocimientos necesarios para optimizar su producción, lo que resulta en decisiones erróneas que afectan negativamente sus rendimientos. La capacitación de los agricultores y la obligación de recibir asesoramiento por parte de técnicos pueden ser estrategias efectivas para mejorar la producción agrícola (Ramos e Izquierdo, 2018). Además, la tecnología continúa evolucionando en los insumos agrícolas, lo que conlleva mejoras significativas en áreas como la fertilización, la protección de cultivos, la siembra, etc.
- La mejora genética. En el pasado, debido a la mejora genética se aumentó la producción potencial de los cultivos en un 1 % anual (Noleppa y Carlsburg, 2021). Con las nuevas técnicas de mejora se espera poder aumentar más rápido la producción. Es importante destacar que el uso de cultivos transgénicos en campo está actualmente prohibidos en la Unión Europea, a excepción del maíz Bt. La legislación

en Europa en torno a los cultivos transgénicos es compleja y el cultivo de variedades modificadas genéticamente es una práctica poco común (CE, 2016).

- Mejoras biotecnológicas en el material de reproducción. Dentro de las mismas, una de las más interesantes es la aplicación de la técnica conocida como *seed priming*, que consiste en la manipulación o alteración de la actividad metabólica de la semilla antes de la germinación. El objetivo es mejorar algunos aspectos germinativos, con el fin último de mejorar la producción (Sher et al., 2019).

2.4 *SEED PRIMING*

El *seed priming* es una técnica prometedora y barata encaminada a mejorar la germinación, el crecimiento y, por tanto, la producción de los cultivos. Para mejorar la producción no solo podemos fijarnos en si aumenta la capacidad productiva de los cultivos, también podemos comprobar si mejora la eficiencia de éstos ante situaciones de estrés, como pueden ser sequias, salinidad y golpes de calor, o incluso si hace a los cultivos más resistentes ante algunos patógenos (Haider et al., 2019). Por tanto, dentro del *seed priming* podemos encontrar un gran número de técnicas, en función de que queramos obtener uno o varios de los siguientes objetivos: bioestimulación, desinfección, o mejora ante situaciones de estrés.

Dentro de las técnicas más utilizadas, destacan las siguientes: *hidropriming*, *osmopriming*, *chemical priming*, *hormonal priming*, *priming* mediante campos magnéticos, rayos gamma o microondas.:

- *Hidropriming*: las semillas se sumergen en agua antes de la siembra, durante un tiempo determinado y luego se secan hasta alcanzar la misma humedad que tenían antes de ser humedecidas. Varios estudios han demostrado que, en condiciones de estrés o salinidad, el *hidropriming* mejora tanto el porcentaje de germinación como la longitud de las plántulas (Kaur et al., 2002).

- *Osmopriming*: consiste en hidratar las semillas como en el caso anterior, pero a un nivel controlado, lo cual desencadena algunas actividades metabólicas pregerminativas (Halmer, 2004). Es importante evitar la hidratación excesiva de las semillas, ya que podría ocasionar daños celulares. Por esta razón, en el *osmopriming* se emplean azúcares o sales para reducir la absorción de agua. Según los hallazgos de Salehzade et al. (2009), el *osmopriming* mejora tanto el porcentaje de germinación como el crecimiento de las plántulas de trigo.

- *Chemical priming*: se introducen las semillas en una solución con productos químicos, ya sean naturales o sintéticos, durante un tiempo determinado. Existen numerosos productos químicos con los que se puede realizar este proceso, algunos de los cuales también tienen efectos fungicidas. Uno de los productos que destaca es el quitosano. Un estudio realizado en trigo reveló un aumento significativo tanto en el porcentaje de germinación como en la velocidad de germinación, en comparación con el grupo de control que no recibió ningún tratamiento (Shao et al., 2005)

- *Hormonal priming*: las hormonas desempeñan un papel fundamental en la fisiología de las plantas, incluida la germinación y el desarrollo en las etapas iniciales. Por lo tanto, al tratar las semillas con ciertas hormonas es posible superar situaciones de estrés en las que los niveles de estas hormonas disminuyen (Yurekli et al., 2004). Las hormonas que más se han estudiado para el *priming* son las giberelinas (GAs), el ácido salicílico (SA) y el ácido jasmónico (JA). En un estudio realizado en arroz, se compararon semillas tratadas con SA con semillas no tratadas, sometiendo las plántulas a situaciones de estrés por frío y deficiencias nutricionales. Como resultado, se encontró que las semillas tratadas soportaron mejor estos dos tipos de estrés (Hussain et al., 2013).

- *Priming* mediante campo magnético: consiste en introducir las semillas dentro de un campo magnético a diferentes intensidades. Estos tratamientos mejoraron aspectos germinativos, como la velocidad de germinación y la longitud de las plúmulas de la soja, en comparación con el grupo de control no tratado (Shine et al., 2011)

- *Priming* mediante rayos gamma: esta técnica consiste en someter las semillas a radiación gamma. Estos tratamientos han demostrado resultados positivos en el cultivo de arroz, obteniendo un incremento en el porcentaje de germinación y un aumento en el desarrollo de la radícula de las plántulas, en comparación con el grupo de control (Macovei et al., 2014).

- *Priming* mediante microondas: se ha investigado cómo afectan tratamientos con microondas a las semillas de cebada, encontrando que mejoraba el porcentaje de germinación y la velocidad de germinación respecto al control (Iuliana et al., 2013).

Además de las anteriores, hay varias técnicas de *priming* que merecen la pena ser destacadas, en primer lugar, aumentar los nutrientes en la semilla, por su eficacia contrastada. En segundo, el *priming* mediante radiación UV y mediante atmósfera saturada de ozono, por su novedad. En el primer caso, dicho aumento de nutrientes se puede conseguir mediante el conocido *nutripriming*, consiste en sumergir las semillas en una solución aireada con nutrientes inorgánicos durante un tiempo determinado para que la semilla los tome. Dada la importancia de estas técnicas de *priming*, se describen con más detalle a continuación.

2.5 SEED PRIMING CON UV

Existen tres tipos de radiación ultravioleta, que se dividen según su longitud de onda: UV-A (320-390 nm), UV-B (280-320 nm) y UV-C (menor de 280 nm). La radiación UV-A representa el 6,3 % de todo el espectro electromagnético que llega a la superficie terrestre y la UV-B representa solo el 1,5% (Araujo et al., 2016). La radiación UV-C es la más peligrosa, ya que provoca daños celulares, aunque por suerte ésta es filtrada totalmente por la capa de ozono. Este escudo también filtra gran parte de la radiación UV-B, pero debido a la reducción de la capa por la contaminación, esta radiación cada vez es mayor en la superficie terrestre, lo que tiene consecuencias negativas para los organismos que la habitan (Hollosy, 2002).

Debido a esta problemática, se ha investigado bastante sobre cuáles pueden ser las consecuencias de esta radiación para las plantas. La mayoría de estos estudios se han centrado en cómo afecta a las plántulas o plantas adultas, pero pocos se han centrado en

las semillas. Los trabajos desarrollados acerca de la radiación UV en las semillas se han centrado en analizar el efecto que las diferentes dosis de radiación tienen en la germinación de éstas. En estos trabajos se ha demostrado que las dosis subletales, no solo carecen de efectos negativos, sino que incluso mejoran algunos aspectos relacionados con la propia germinación (Badrize et al., 2016). A raíz de estos estudios la aplicación de radiación UV pasó a convertirse en una prometedora técnica de *priming* para mejorar los parámetros germinativos de la semilla. Esta técnica, de la que todavía no se ha estudiado mucho, sería de muy fácil aplicación en una planta de selección y envasado de semillas. Además, no tendría gran coste y sería totalmente ecológica, por lo que encaja perfectamente como una solución para la problemática actual (Semenov et al., 2020).

Como se ha mencionado anteriormente, las técnicas *seed priming* pueden tener tres vías de actuación: como bioestimulante, desinfectante o de mejora ante situaciones de estrés. El *priming* con UV utilizaría las tres vías. Actúa como desinfectante, si bien es cierto que las dosis necesarias para eliminar por completo los posibles patógenos son muy elevadas, lo cual resulta perjudicial para la germinación. Por lo tanto, como desinfectante, no se han obtenido resultados satisfactorios (Anarbaeb et al., 2021). El efecto bioestimulante ha sido demostrado en algunos estudios, reduciendo el tiempo de germinación y aumentando la longitud de radícula (Semenov et al., 2020). En cuanto a las situaciones de estrés, ya sea de origen abiótico o biótico, una germinación más rápida y un mayor crecimiento tanto de la plúmula como de la radícula puede mitigar dicho estrés (Thomas y Puthur, 2017).

No hay un completo consenso sobre cómo actúa la radiación UV en la semilla. Algunos autores sugieren que dosis bajas de radiación UV modifican la permeabilidad de la membrana celular, lo que provoca el inicio de diversas respuestas metabólicas, como la síntesis de antioxidantes (Kacharava et al., 2009). Esta síntesis se produce debido a que la radiación UV estimula la producción de formas reactivas del oxígeno (ROS), que causan daños oxidativos en las biomoléculas (Bartolic et al., 2022). Por lo tanto, estas respuestas desencadenan cambios en la regulación hormonal de las semillas, lo que, en ciertas especies, puede conducir a mejoras en aspectos relacionados con la germinación (Araujo et al., 2016).

2.6 *SEED PRIMING* CON OZONO

El ozono es un oxidante natural con gran capacidad desinfectante. Es capaz de destruir no solo contaminantes naturales, como hongos, sino también contaminantes industriales, como los pesticidas. Estos contaminantes pueden inducir problemas en la germinación, como reducción del porcentaje de germinación, o aumento del número de plántulas anormales (Pandiselvam et al., 2020). Además de la vía de actuación como desinfectante, también se ha comprobado su capacidad bioestimulante, como veremos más adelante.

Con respecto a la vía desinfectante, se han utilizado tratamientos de semillas en atmósfera de ozono con éxito para la eliminación de micotoxinas (McKencie et al., 1997) y hongos (Kells et al., 2001). Otros estudios comprobaron que las dosis mínimas necesarias para la eliminación de hongos no tienen efectos negativos sobre la germinación del trigo (Wu et al., 2006).

Recientemente, se han utilizado tratamientos con ozono en semillas de trigo para evaluar su efecto sobre algunos aspectos germinativos, comprobándose que mejoraba el porcentaje y la velocidad de germinación (Avdeeva et al., 2018). Otro estudio realizado en maíz demostró que no solo mejora el porcentaje y velocidad de germinación, sino que además mejora la velocidad con la que crece la radícula (Violleau et al., 2007).

Para la vía bioestimulante, el modo de acción del ozono en las semillas podría ser explicado también mediante las ROS. Tradicionalmente, las ROS se consideraban muy perjudiciales, ya que envejecían o desecaban las semillas. Sin embargo, algunos estudios han demostrado que el papel de las ROS no siempre es desfavorable, ya que intervienen en el proceso de señalización celular, que provoca el comienzo de la germinación (Sudhakar et al., 2011).

El estrés oxidativo generado por la exposición al ozono puede tener efectos sobre las semillas y su capacidad de germinación. El ozono puede generar una acumulación de ROS en las semillas, lo que puede desencadenar una respuesta fisiológica positiva, rompiendo la latencia. (El-Maarouf-Bouteau y Bailly, 2008).

Además, se ha observado que la acumulación de ROS puede afectar los niveles de hormonas vegetales, como el ácido abscísico (ABA), las GAs y el etileno (ET). El ABA es una hormona que inhibe la germinación de las semillas, mientras que las GAs y el ET están asociados con los mecanismos que promueven la germinación y el crecimiento de la radícula. El estrés oxidativo causado por el ozono puede reducir los niveles de ABA en las semillas, lo que, a su vez, puede desencadenar la liberación de GAs y ET (Farooq et al., 2021). Sin embargo, es importante destacar que la interacción entre ROS y hormonas en la germinación de las semillas es un campo de investigación en curso y el papel que juega puede variar dependiendo de la especie de planta, el nivel de estrés oxidativo y otros factores ambientales. Se requiere más investigación para comprender completamente los mecanismos involucrados y los efectos del ozono en la germinación de las semillas.

2.7 NUTRIPRIMING

Los nutrientes desempeñan un papel crucial en el desarrollo y la regulación fisiológica de las plantas. Estos se dividen en macronutrientes y micronutrientes, dependiendo de la cantidad necesaria para un óptimo desarrollo de la planta (Urbano, 1995). Algunos de estos micronutrientes, como el cobre (Cu), zinc (Zn), manganeso (Mn), hierro (Fe), molibdeno (Mo) y boro (B), actúan como cofactores de enzimas (Hansh y Mendel, 2009), desempeñando un papel fundamental en diversos procesos metabólicos de las plantas. Estos procesos pueden ser alterados mediante la modificación de la concentración de micronutriente

El *seed priming* con micronutrientes, también conocido como *nutripriming*, es una técnica en la cual las semillas se sumergen en soluciones con diferentes concentraciones de nutrientes durante un tiempo determinado. Luego, las semillas se secan al aire y pueden ser sembradas (Chackraborty y Bose, 2018). El objetivo de esta técnica es inducir cambios pregerminativos en las semillas, relacionados con su metabolismo, con el fin de mejorar la velocidad y el porcentaje de germinación, aumentar la resistencia a posibles situaciones de estrés y, en última instancia, incrementar la producción de los cultivos (Kumar, 2020). Los micronutrientes que más parecen actuar en esta línea son el Zn, B y Fe.

-Zn: es un componente regulador de varias enzimas y participa en la regulación del crecimiento y la formación de clorofila. Su deficiencia puede causar clorosis internervial, especialmente en hojas jóvenes (Brown et al., 1993). Sin embargo, su exceso puede provocar toxicidad y frenar el crecimiento de la planta. Con respecto al *nutripriming*, en la mayoría de los estudios, los tratamientos con Zn se realizan utilizando sulfato de zinc ($ZnSO_4$) (Kumar et al., 2020). Por ejemplo, en maíz, el *nutripriming* de las semillas con una solución al 4% de $ZnSO_4$ mejoró varios aspectos del cultivo posterior, como la altura de la planta, la anchura del tallo, el tamaño de la mazorca, el número de granos por mazorca, el peso de mil granos, la producción (toneladas/ha) y el contenido de proteína en el grano, en condiciones de aridez (Raza et al., 2023). Asimismo, se ha observado un aumento en la producción de trigo al realizar el tratamiento de las semillas con concentraciones de $ZnSO_4$ del 0,3% en la solución (Harris et al., 2007)

- B: es un micronutriente esencial para la mayoría de los cultivos, desde la germinación hasta la madurez fisiológica, debido a su papel en la regulación de diversos procesos fisiológicos, como la división y crecimiento celular, la respiración y la translocación de azúcares (Iqbal et al., 2012). Las deficiencias de boro suelen manifestarse principalmente en las partes jóvenes de la planta, donde las hojas pueden deformarse y adquirir tonalidades oscuras. Además, se observa una reducción en el crecimiento terminal, e incluso puede provocar la muerte de la yema terminal, lo que resulta en la formación de más ramas laterales (Urbano, 1995).

Se han llevado a cabo estudios de *nutripriming* con B en trigo utilizando soluciones de ácido bórico (H_3BO_3) con una concentración de 8 mM, y se ha encontrado que este tratamiento mejoraba la longitud de la plúmula y la radícula, en comparación con el grupo de control y el tratamiento de *hidropriming* (Chakraborty et al., 2018). Asimismo, se han realizado pruebas en trigo utilizando bórax $Na_2[B_4O_5(OH)_4] \cdot 8H_2O$ y ácido bórico, y se ha observado que el tratamiento con bórax a una concentración de 0,01 M resultó ser más efectivo respecto al

control, ya que mejoraba el porcentaje de germinación, el crecimiento de las plántulas y la producción total de granos (Iqbal et al., 2017).

- Fe: es un micronutriente esencial debido a que contribuye a la formación de moléculas de clorofila, molécula fundamental para el metabolismo vegetal (Zhang 2014). Su carencia provoca clorosis internervial en hojas jóvenes, debido a la falta de clorofila (Abadía et al., 2011). La carencia de Fe es fácil encontrarla en suelos calcáreos, debido a su pH elevado, que provoca que el hierro se encuentre en formas no solubles para las plantas (Hemalatha y Venkatesan, 2011).

La mayoría de los estudios de *nutripriming* con Fe utilizan el sulfato de hierro (FeSO_4). Un estudio realizado en semillas de maíz sembradas bajo condiciones de estrés debido a bajas temperaturas, ha revelado que la aplicación de tratamientos con una concentración de 8 mM de sulfato de hierro conllevaba mejoras significativas en el tamaño de las plántulas, tanto en el desarrollo de las raíces como en la parte aérea (Imran et al., 2013). Otro estudio realizado en trigo mostró que semillas tratadas en soluciones con 2 mg/L de sulfato de hierro mejoraron el ahijamiento y la producción de grano (Reis et al., 2018).

3. OBJETIVOS

El objetivo general de este trabajo es, mediante técnicas de *seed priming*, compensar los descensos productivos esperados en dos cultivos clave en Castilla y León, como son el trigo blando y la cebada de dos carreras, debido al contexto actual de restricciones políticas en el uso de insumos agrícolas y las previsibles condiciones climáticas provocadas por el cambio climático.

Dentro de las técnicas de *seed priming* este estudio se centra en 3: estimulación mediante UV, ozono y *nutripriming*, que son técnicas novedosas y poco probadas. Por tanto, esta investigación pretende servir como una valoración preliminar sobre la eficacia de estas técnicas, para en caso de obtener resultados positivos, desarrollarlas en posteriores trabajos.

Este objetivo general podemos desglosarlo en los siguientes objetivos específicos:

- Evaluar el efecto de los tratamientos con UV y ozono a diferentes dosis en la semilla sobre su capacidad de germinación y sobre el crecimiento de la plántula en sus estadios iniciales.
- Analizar el efecto del aumento de micronutrientes (Zn, B y Fe) en la semilla sobre su capacidad germinativa y sobre el crecimiento de la plántula en sus estadios iniciales, valorando cuál de los nutrientes es más eficaz.
- Evaluar la influencia del estrés hídrico sobre la eficacia de las técnicas *nutripriming*.

4. MATERIAL Y MÉTODOS

4.1 MATERIAL VEGETAL

Para los diferentes ensayos se utilizaron semillas de dos cultivos, trigo blando (*Triticum aestivum*) y cebada de dos carreras (*Hordeum vulgare distichum*). El trigo utilizado fue de la variedad comercial Rimbaud, la cual fue multiplicada y seleccionada por AGROPAL durante la cosecha del año 2022. Por otro lado, la cebada empleada correspondió a la variedad Lavanda, también multiplicada y seleccionada por AGROPAL en el mismo periodo. Estas variedades fueron seleccionadas debido a su amplia utilización en la región de Castilla y León. Ambas variedades fueron tratadas antes del envasado con fungicidas sistémicos por la propia empresa. En el caso de la cebada, se utilizó Fludioxonil + Tebuconazol, mientras que el trigo fue tratado con Tebuconazol + Prothioconazol.

4.2 TRATAMIENTOS

4.2.1 TRATAMIENTOS UV

Para la exposición a la radiación UV, se utilizó un equipo (figura 4.1) con una lámpara modelo Philips TUV PL-L 95W/4P HO 1CT/25, la cual emitía una radiación UV-C de 27 W. Se eligió esta radiación ya que, acorde con la bibliografía analizada en la introducción, parecía ser una de las más eficaces en el *priming*. El equipo utilizado fue desarrollado por la empresa INGEMOV, bajo la denominación de DIVI. Este es un equipo de acero, el cual cuenta con un compartimento, sobre el que se pueden extender las semillas, (figura 4.1).



Figura 4.1 equipo tratamiento UV y ozono, parte exterior (izquierda) y parte interior (derecha).

Para los diferentes tratamientos, las semillas se colocaron sobre una superficie plana ubicada a una distancia de 60 cm de la lámpara UV. Se dispusieron de manera uniforme, sin colocar unas semillas encima de otras.

Para calcular la dosis de exposición, se empleó la fórmula propuesta por López-Rubira (2007):

$$D \left(\frac{Kj}{m^2} \right) = \frac{I \left(\frac{W}{m^2} \right) \times t(s)}{1000}$$

En esta ecuación, D representa la dosis, I se refiere a la intensidad del flujo radiante y t corresponde al tiempo de exposición. La ficha técnica de la bombilla especifica que la I es de 423 W/m².

Tanto para el trigo, como para la cebada, se llevaron a cabo los mismos tratamientos de radiación UV. De inicio, se probaron 10 tiempos de exposición diferentes, con un intervalo de un minuto entre cada una, con el objetivo de determinar la dosis que producía los mejores resultados, así como identificar aquella a partir de la cual se obtenían

resultados desfavorables en comparación con el grupo de control (sin tratar). Los diferentes tratamientos se detallan en la tabla 4.1 y han sido calculados con la fórmula de López-Rubira (2007) antes descrita.

Tabla 4.1: dosis de radiaciones UV-B realizadas en trigo y cebada

T(s)	D ($\frac{KJ}{m^2}$)
60	25,38
120	50,76
180	76,14
240	101,52
300	126,9
360	152,28
420	177,66
480	203,04
540	228,42
600	253,8

4.2.2 TRATAMIENTOS OZONO

Para el ozono, las semillas se colocaron en el mismo equipo de aplicación y de la misma manera que para la radiación UV. La dosis de aplicación se calculó, en este caso, utilizando la fórmula de Avdeeva et al. (2018):

$$D \left(\frac{g * s}{m^3} \right) = C \left(\frac{g}{m^3} \right) * t (segundos)$$

Donde D es la dosis, C es la concentración de ozono en la cámara y t es el tiempo en segundos. La concentración en la cámara se mantuvo constante en 0,0206 g/m³, medido con un ozonómetro marca JXCT modelo JXBS-GAS.

Las dosis utilizadas para el trigo y la cebada fueron las mismas, empleando un total de nueve tiempos de exposición: comenzando con un minuto, luego 2.5 minutos, y siguiendo con intervalos de 2.5 minutos. El objetivo era determinar la dosis que proporcionara los mejores resultados. Los diferentes tratamientos y sus respectivas dosis se detallan en la tabla 4.2.

Tabla 4.2: dosis de ozono realizadas en trigo y cebada

T(s)	$D \left(\frac{g * s}{m^3} \right)$
60	1,24
150	3,09
300	6,18
450	9,27
600	12,36
750	15,45
900	18,54
1050	21,63
1200	24,72

4.2.3 TRATAMIENTOS *NUTRIPRIMING*

La técnica utilizada consistió en sumergir las semillas en diferentes soluciones conteniendo los diferentes micronutrientes a diferentes concentraciones (Tabla 4.3) durante 16 horas, utilizando frascos de cristal (figura 4.2), con 400 g de semillas por frasco, y un frasco por cada tratamiento. Posteriormente, las semillas se secaron al aire, a temperatura ambiente durante 3 días (figura 4.3)



Figura 4.2: recipientes donde se realizó y el tratamiento *nutripriming* y se almacenó la semilla.



Figura 4.3: secado de semillas, extendidas y a temperatura ambiente tras el nutripriming.

Para el tratamiento de Fe, se utilizó sulfato de hierro heptahidratado ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) con concentraciones de 50, 500 y 5000 mg/L. Para el tratamiento de Zn, se utilizó sulfato de zinc heptadritado ($\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) con concentraciones de 50, 500 y 5000 mg/L. Para el tratamiento de B, se utilizó bórax ($\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$) con concentraciones de 10, 100 y 1000 mg/L. Las dosis fueron seleccionadas acorde a las encontradas en la bibliografía en estudios similares. Para las comparaciones, como control, también se utilizó la técnica de *hidropriming*, es decir utilizar solamente agua en la solución. En todos los casos el agua utilizada era destilada.

Tabla 4.3: concentraciones de micronutrientes utilizadas en la solución para el tratamiento *nutripriming*

Cultivo	Micronutriente	Concentración (mg/l)		
Cebada	<i>Hidropriming</i>			
		0		
		50		
	Fe		500	
			5000	
		Zn		50
				500
			5000	
	B			10
			100	
			1000	
			0	
Trigo	<i>Hidropriming</i>			
		50		
	Fe		500	
			5000	
		Zn		50
				500
			5000	
	B			10
			100	
			1000	
			1000	

4.3 PRUEBAS DE GERMINACIÓN EN PLACA

Todas las pruebas de germinación en placa se realizaron igual para trigo y cebada. Estas pruebas se realizaron para las técnicas de *priming* en las que se habían utilizado varias dosis de aplicación, con el fin de seleccionar la dosis que producía los mejores resultados, que será ya con la que se realicen los ensayos en bandejas de alveolos que se explican en el apartado siguiente.

En las diferentes técnicas de *priming* estas pruebas se han realizado con ligeras diferencias, por lo que se explicarán por separado.

4.3.1 OZONO Y UV

Para los tratamientos UV y ozono, se siguió el siguiente procedimiento: se utilizaron placas Petri de 90 mm, en donde se dispusieron 5 semillas por placa, distribuidas lo más separado posible unas de otras para facilitar las mediciones. Para cada tratamiento se realizaron 4 repeticiones (placas). En cada placa, se colocó un papel de filtro de 60

gramos/m², seguido de las semillas, cubriéndolas con otro papel de las mismas características. A cada placa se le añadieron 3 ml de agua destilada.

Previamente al uso, los papeles de filtro, el agua destilada y todos los utensilios empleados fueron sometidos a desinfección mediante autoclave a 120 °C, durante 20 minutos.

Una vez preparadas las placas, fueron guardadas en cámara de germinación de marca IBERCEX, modelo IGCS 900 HR-LED (figura 4.4), que contaba con control de humedad y temperatura, siendo configurada a 25°C y 70% de humedad relativa.



Figura 4.4: cámara de germinación IBERCEX ,modelo IGCS 900 HR-LED

Las placas se colocaron aleatoriamente dentro de la cámara, evitando posibles diferencias en las condiciones debidas a la ubicación en el interior de ésta. Cada dos días, todas las placas eran sacadas de la cámara para verificar su nivel de humedad. Al reintroducirlas en la cámara, se volvieron a ubicar de forma aleatoria, minimizando cualquier posible ventaja posicional para la germinación.

Los conteos de germinación y las mediciones de longitud de la radícula y de la plúmula se realizaron a los 8 días desde el inicio del ensayo

4.3.2 NUTRIPRIMING

Para llevar a cabo el *nutripriming*, seguimos el mismo procedimiento que en los tratamientos de UV y ozono. Sin embargo, en este caso, utilizamos tres placas Petri, cada una con 10 semillas. Las mediciones se realizaron después de 7 días, siguiendo un proceso similar al de los otros tratamientos. La única diferencia fue que, en lugar de medir la longitud de la radícula, sometimos la raíz a un proceso de secado en una estufa y luego registramos su peso seco.

4.4 PRUEBA CRECIMIENTO EN BANDEJA DE ALVEOLOS

4.4.1 OZONO Y UV

En los ensayos llevados a cabo en bandejas de alveolos , se empleó perlita como sustrato, como se muestra en la figura 4.5. Las semillas se sembraron a una profundidad de 3 cm. Se colocaron 18 semillas por tratamiento en una bandeja que constaba de 150 alveolos, utilizando un diseño completamente aleatorio para evitar el efecto de la posición. Los tratamientos evaluados se muestran en la tabla 4.4.

Tabla 4.4: tratamientos UV y ozono utilizados en las bandejas

Cultivo	Tratamiento	Dosis (minutos)
Cebada	Control	0
	UV	3
	Ozono	5
	UV+ Ozono	3+5
Trigo	Control	0
	UV	3
	Ozono	5
	UV+ Ozono	3+5

En los alveolos más externos de la bandeja se sembraron semillas sin tratar, con el fin de evitar el efecto borde. Posteriormente, las bandejas se introdujeron en una cámara de germinación (figura 4.6) con una temperatura de 25°C y una humedad relativa del 70%. Durante todo el ensayo, se aseguró que las bandejas recibieran riego cada 2-3 días, manteniendo la humedad del sustrato al nivel de capacidad de campo.

Una vez iniciado el ensayo, se realizaron mediciones diarias para registrar el momento de la germinación. Además, a los 7 días del comienzo se realizó una medición de la altura de las plántulas. Al finalizar el ensayo, a los 15 días, se volvió a medir la longitud de la plúmula. También se recolectaron las raíces, las cuales se secaron en una estufa a 65°C hasta perder toda la humedad con el fin de medir el peso seco de las raíces.

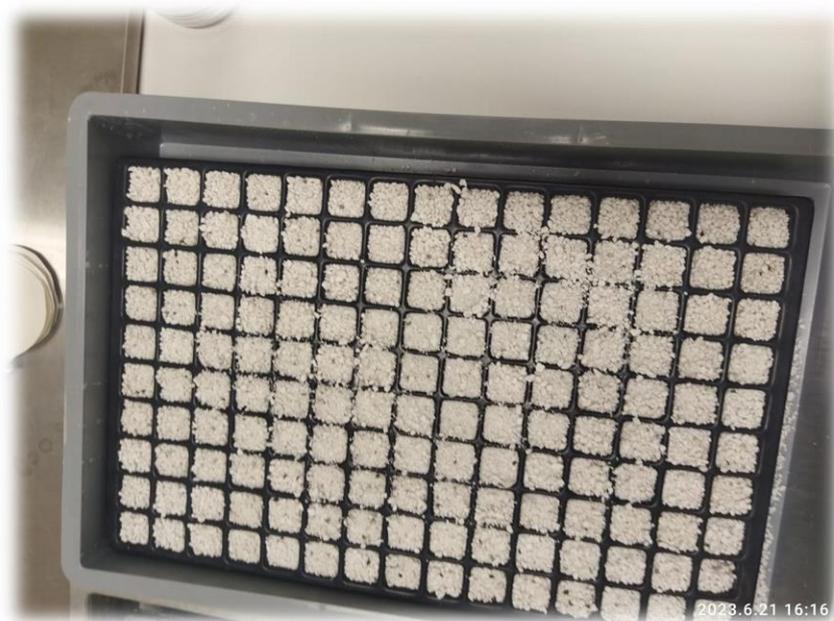


Figura 4.5: bandeja de alveolos con sustrato a base de perlita

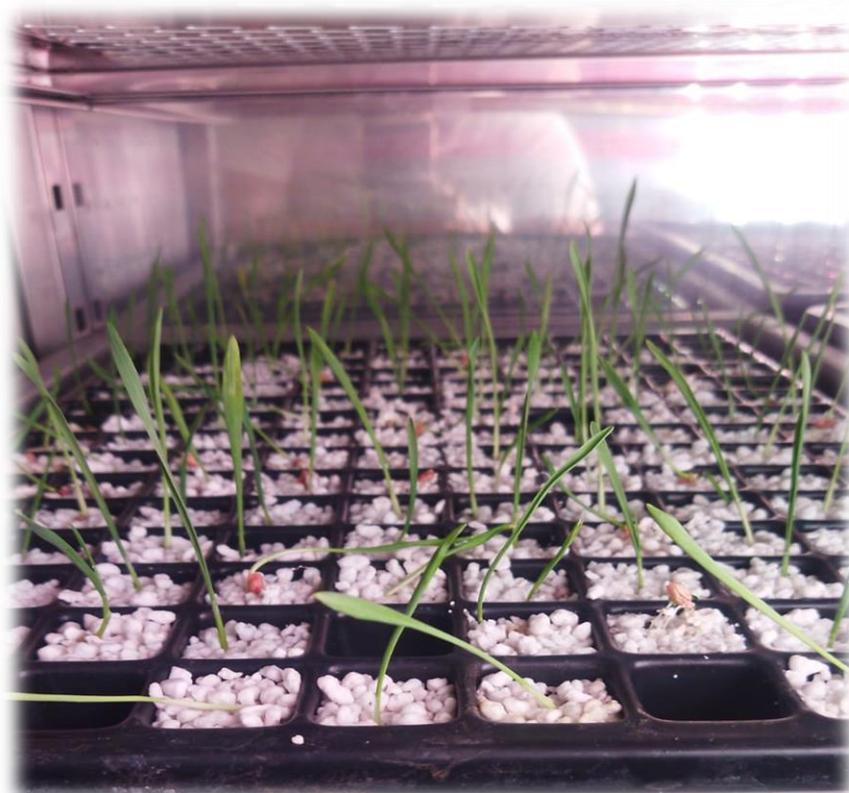


Figura 4.6: plántulas de trigo tratadas con UV y ozono, a los 15 días de la siembra

4.4.2 *NUTRIPRIMING*

Con las concentraciones de micronutrientes que produjeron los mejores resultados en placa se realizó el ensayo en bandeja de alveolos.

El procedimiento y el material utilizado fue el mismo que el utilizado en el ensayo de UV+Ozono. No obstante, en esta investigación también se quiso evaluar la influencia del estado de estrés de la planta, en este caso un estrés hídrico, en la eficacia del *priming*. Para ello se realizó el ensayo tanto en condiciones de riego normal, regando cada 2-3 días hasta capacidad de campo, como en condiciones de riego deficitario, regando cada 6-7 días hasta capacidad de campo, durante la duración del ensayo.

Los tratamientos evaluados pueden ser consultados en la Tabla 4.5. Se sembraron 18 semillas por tratamiento, utilizando un diseño completamente aleatorio para evitar posibles efectos debidos a la posición de las plantas. La primera medición se realizó a los 6 días y se tomaron medidas de la altura de las plántulas. A los 13 días, se registraron nuevamente las medidas de la parte aérea de las plántulas, así como el peso seco, tanto de la parte aérea como del sistema radicular de cada planta de forma individual, una vez recogido y secado en estufa a 65 °C se midió el peso seco de radícula y plúmula.

Se ha utilizado como control semillas tratadas con la técnica *hidropriming* con el objetivo de identificar si es el nutriente el factor que mejora las propiedades germinativas o si el efecto se debe a que los tratamientos con los diferentes nutrientes las semillas se sumergen en agua al igual que sucede en el *hidropriming*.

Tabla 4.5: tratamientos *nutripriming* utilizados en las bandejas

Micronutriente	Concentración (mg/l)	Cultivo
<i>Hidropriming</i>		Cebada
Fe	500	Cebada
Zn	500	Cebada
B	100	Cebada
<i>Hidropriming</i>		Trigo
Fe	500	Trigo
Zn	500	Trigo
B	100	Trigo

4.5. ANÁLISIS DE CONCENTRACIÓN DE MICRONUTRIENTES EN SEMILLA

Las diferentes semillas tratadas con la técnica *nutripriming* fueron enviadas al Laboratorio de Técnicas Instrumentales de la Universidad de Valladolid, el cual, mediante la técnica Espectrometría de Masas con Plasma Acoplado Inductivamente (ICP-MS), cuantificó la concentración de los tres micronutrientes estudiados, Zn, B y Fe, en las diferentes muestras.

La técnica ICP-MS es un método analítico que se utiliza para medir la cantidad de elementos químicos en una muestra, incluso en concentraciones muy bajas, mediante el uso de un plasma caliente y un espectrómetro de masas (Padilla-Cuevas et al., 2020). El equipo utilizado en el laboratorio fue ICP-MS con Sistema de Reacción Octopolar 7800 de marca Agilent.

Para la preparación de las muestras hubo que procesar las semillas con un molinillo eléctrico, de marca Komo, modelo Fidibus, ya que para el análisis es imprescindible hacerlo en forma de harina.

4.6 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los datos recopilados durante las mediciones, que incluyeron el porcentaje de germinación, peso de plúmula, peso de radícula, longitud de plúmula y longitud de radícula, fueron sometidos a análisis utilizando el lenguaje de programación R.

Para evaluar el porcentaje de germinación, se llevó a cabo un análisis de chi cuadrado, considerando un nivel de significación $\alpha = 0,05$. Este análisis permitió determinar si existían diferencias significativas en las tasas de germinación entre los grupos de tratamiento.

Para las mediciones biométricas, se realizó un análisis de varianza (ANOVA) de una vía, con el propósito de investigar si el tratamiento aplicado tenía un impacto significativo en los diversos parámetros estudiados. La comparación de medias se llevó a cabo utilizando la prueba de comparaciones múltiples de Tukey, con un nivel de significación $\alpha = 0,05$.

En los análisis paramétricos (ANOVAs) se comprobó antes que los datos cumplían las hipótesis de normalidad y homocedasticidad mediante test de Kolmogorov-Smirnov y test de Levene respectivamente.

5. RESULTADOS

5.1 PRIMING CON UV Y/O OZONO

5.1.1 ANÁLISIS GERMINACIÓN EN PLACA PETRI

El test chi cuadrado realizado mostró como la variable tratamiento no afectó significativamente el porcentaje de germinación en el trigo (tabla 5.1), pero sí en la cebada (tabla 5.2). Mientras que en el caso del trigo, con independencia del tratamiento, todos los valores se situaron por encima del 90% de germinación (tabla 5.1), en el caso de la cebada, el tratamiento con ozono durante 15 min y el de UV durante 1 min, redujeron dicho porcentaje al 70% y 55%, respectivamente (tabla 5.2). Ningún tratamiento mejoró al control en el porcentaje de germinación tras 8 días.

Tabla 5.1: porcentaje de germinación de las semillas de trigo a los 8 días en función de los diferentes tratamientos, el número incluido en el nombre del tratamiento representa el tiempo de exposición en minutos de cada uno. Se incluye también un resumen (grados de libertad: gl; estadístico χ^2 y el *p*-valor) del test de la Chi cuadrado realizado.

Tratamiento	% Germinación
Testigo	97,5
Ozono_1	95
Ozono_2,5	90
Ozono_5	100
Ozono_7,5	100
Ozono_10	100
Ozono_12,5	100
Ozono_15	100
Ozono_17,5	95
Ozono_20	100
UV_1	90
UV_2	100
UV_3	100
UV_4	95
UV_5	100
UV_6	95
UV_7	95
UV_8	100
UV_9	90
UV_10	100
gl	19
Estadístico χ^2	22,329
<i>P</i> -valor	0,282

Tabla 5.2: porcentaje de germinación de las semillas de cebada a los 8 días en función de los diferentes tratamientos, el número incluido en el nombre del tratamiento representa el tiempo de exposición en minutos de cada uno. Se incluye también un resumen (grados de libertad: gl; estadístico χ^2 y el p -valor) del test de la Chi cuadrado realizado. Letras distintas representan diferencias significativas según prueba de comparaciones múltiples.

Tratamiento	% Germinación	
Testigo	95	a
Ozono_1	100	a
Ozono_2,5	90	a
Ozono_5	95	a
Ozono_7,5	100	a
Ozono_10	95	a
Ozono_12,5	100	a
Ozono_15	70	b
Ozono_17,5	95	a
Ozono_20	85	ab
UV_1	55	b
UV_2	95	a
UV_3	95	a
UV_4	90	a
UV_5	95	a
UV_6	95	a
UV_7	100	a
UV_8	100	a
UV_9	90	a
UV_10	95	a
gl	19	
Estadístico χ^2	60,207	
P -valor	0,000003	

5.1.2 ANÁLISIS DEL CRECIMIENTO EN PLACA PETRI

En este estudio se examinaron qué dosis de tratamientos con ozono y UV arrojaron mejores resultados en cuanto al crecimiento radicular y de plúmula, tanto en trigo como en cebada. Con el fin de utilizar estas dosis en el ensayo realizado en las bandejas de alveolos.

La prueba ANOVA indicó que la variable tratamiento afectó de manera significativa a la longitud de la plúmula y la radícula, tanto en el caso del trigo como en el de la cebada (tabla 5.3).

Tabla 5.3: información estadística del ANOVA de una vía (grados de libertad, estadístico *F* y *P*-valor), correspondiente a la influencia del tratamiento en la longitud de radícula y plúmula de las plántulas de trigo y cebada a los 8 días.

Parámetro analizado	Grados de libertad	Estadístico (<i>F</i>)	<i>P</i> -valor
Longitud raíz trigo	19	77,67	<0,001
Longitud plúmula trigo	19	2,12	0,008
Longitud raíz cebada	19	11,59	<0.001
Longitud plúmula cebada	19	2,22	0,006

La medición de la longitud de la raíz de las plántulas de trigo reveló, según los resultados del test de Tukey (figura 5.1), que los tratamientos con ozono mejoraron significativamente la longitud en comparación con el control y los tratamientos UV, excepto el tratamiento de un minuto con ozono, que no mostró diferencias significativas con el control. Por lo tanto, los tratamientos UV no demostraron mejoras con respecto al control.

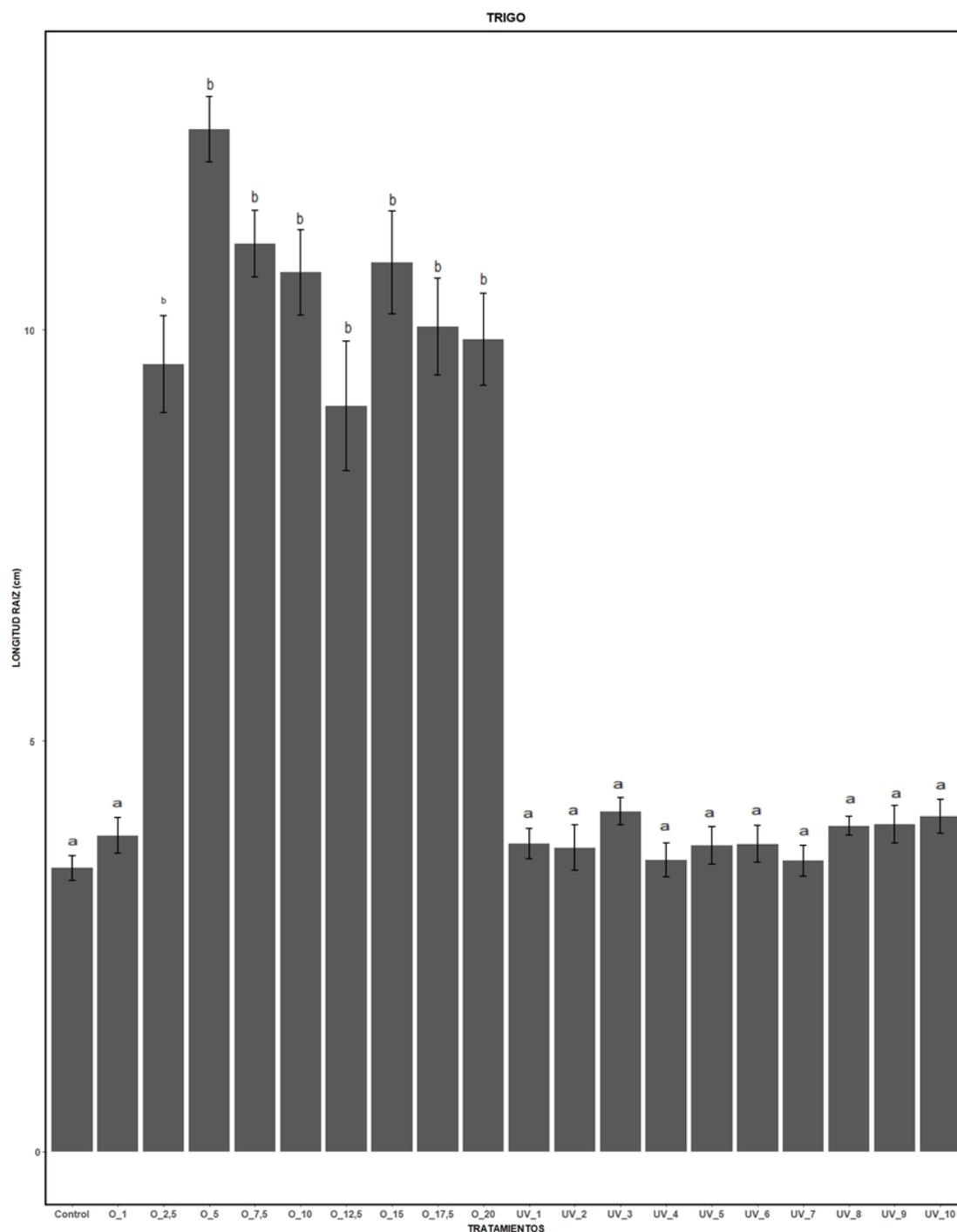


Figura 5.1: longitud de radícula (las barras representan la media y las líneas de error, el error estándar) de las plántulas de trigo a los 8 días, con las diferentes dosis de aplicación y para los diferentes tratamientos. La letra de los tratamientos representa el tipo de tratamiento (O: ozono y UV: ultravioleta) y el número el tiempo de exposición en minutos. Letras de significación diferentes indican diferencias significativas según test de Tukey a un nivel de significación $\alpha=0,05$.

En la longitud de la plúmula, se observó que el tratamiento con 5 minutos de ozono incrementó la longitud en comparación con el control (figura 5.2). En el caso de los demás tratamientos, no se demostró ninguna mejora en la longitud de la plúmula en comparación con el control.

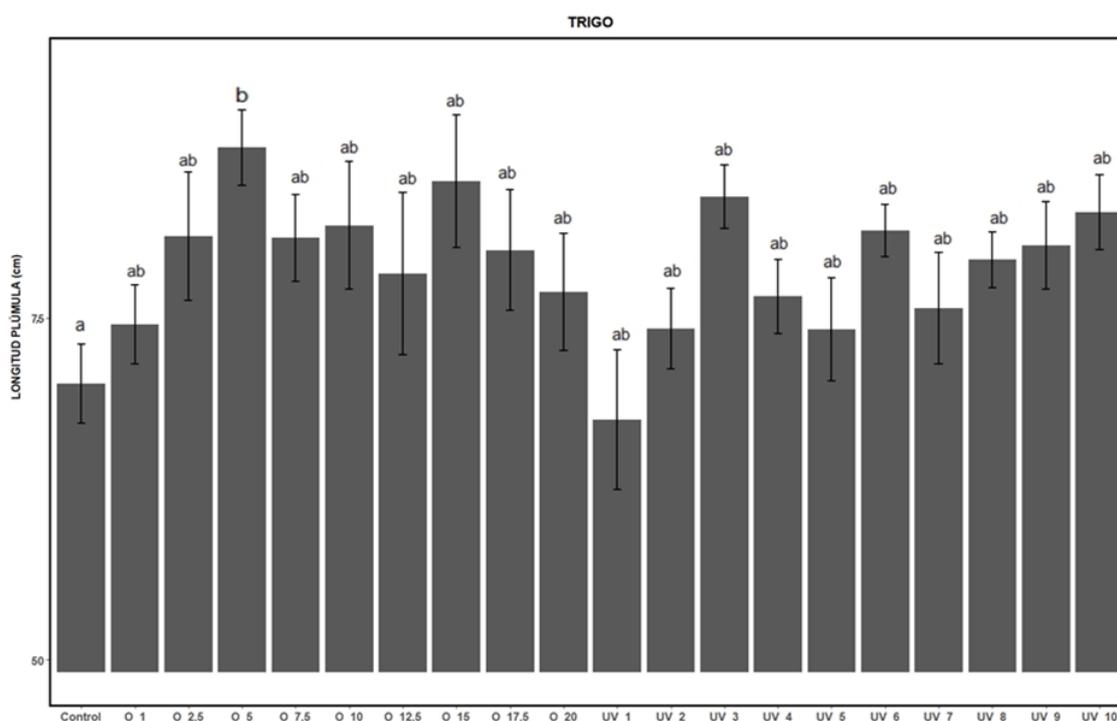


Figura 5.2: longitud de plúmula (las barras representan la media y las líneas de error, el error estándar) de las plántulas de trigo a los 8 días, con las diferentes dosis de aplicación y para los diferentes tratamientos. La letra de los tratamientos representa el tipo de tratamiento (O: ozono y UV: ultravioleta) y el número el tiempo de exposición en minutos. Letras de significación diferentes indican diferencias significativas según test de Tukey a un nivel de significación $\alpha=0,05$.

En el caso de la cebada (figura 5.3), se comprobó que todos los tratamientos con ozono y con UV aumentaron significativamente la longitud de raíz, en comparación con el testigo, a excepción de la dosis de un minuto UV y 20 minutos de ozono que no mostraron diferencias significativas.

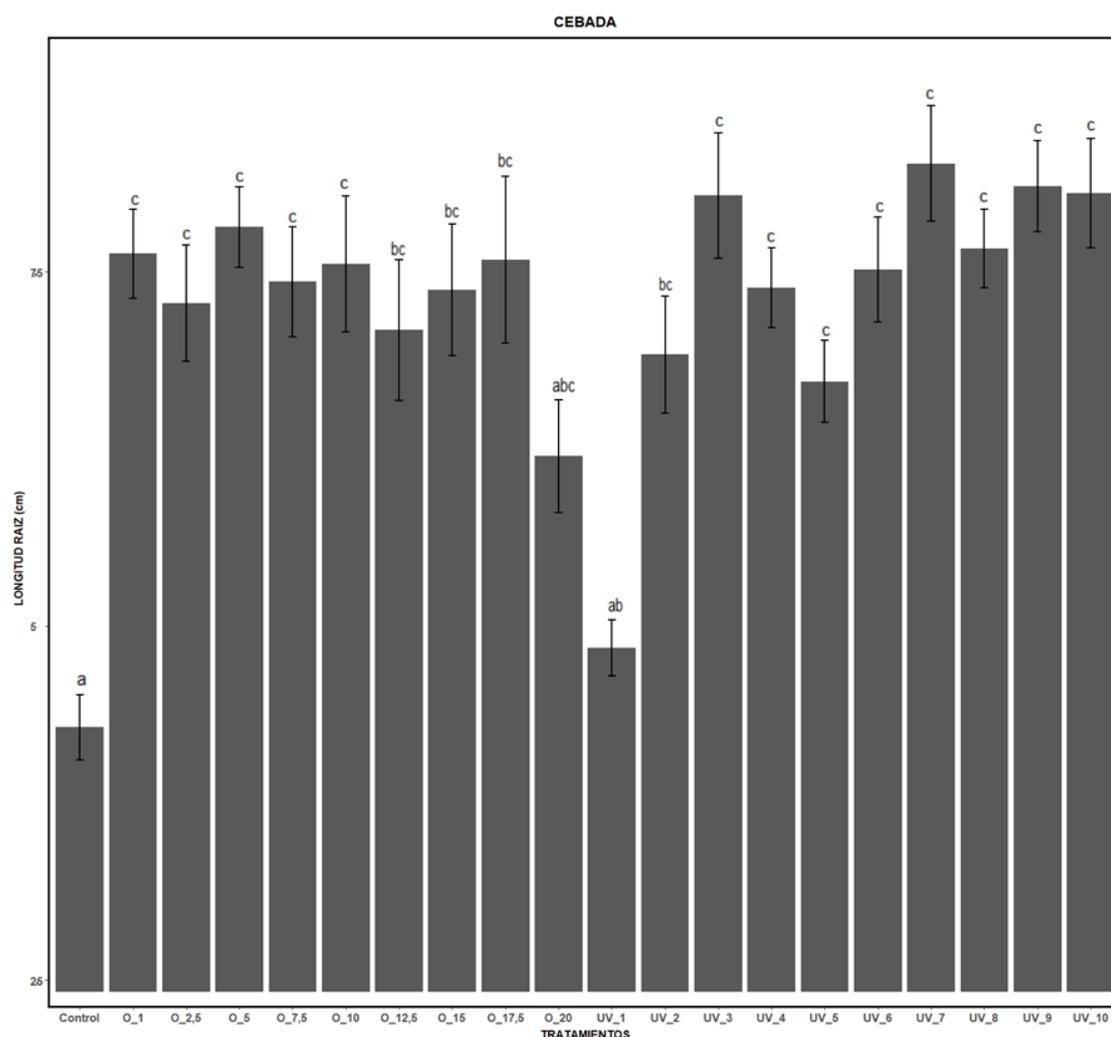


Figura 5.3: longitud de radícula (las barras representan la media y las líneas de error, el error estándar) de las plántulas de cebada a los 8 días con las diferentes dosis de aplicación y para los diferentes tratamientos. La letra de los tratamientos representa el tipo de tratamiento (O: ozono y UV: ultravioleta) y el número el tiempo de exposición en minutos. Letras de significación diferentes indican diferencias significativas según test de Tukey a un nivel de significación $\alpha=0,05$.

En cuanto a la longitud de plúmula de la cebada, pese a existir influencia significativa del *priming*, no se puso de manifiesto ninguna mejora significativa, respecto al control, por parte de los tratamientos (figura 5.4). La única diferencia significativa la tuvo el tratamiento UV de 3 minutos que incrementó la longitud, respecto al tratamiento de 20 minutos con ozono.

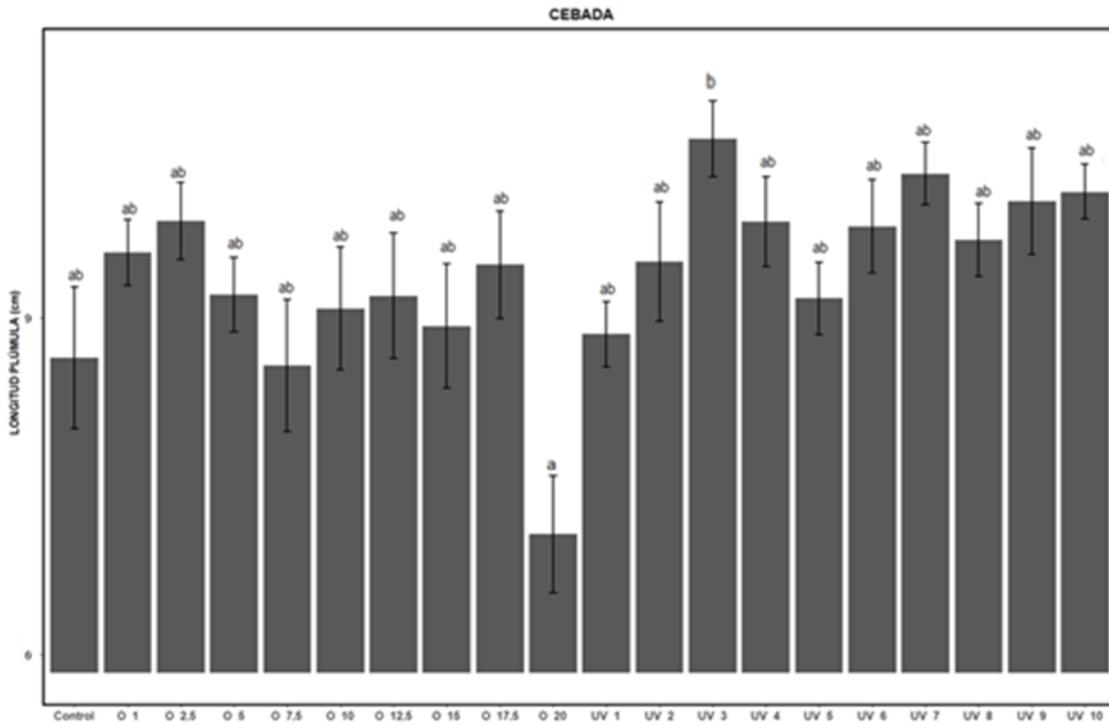


Figura 5.4: longitud de plúmula (las barras representan la media y las líneas de error, el error estándar) de las plántulas de cebada a los 8 días, con las diferentes dosis de aplicación y para los diferentes tratamientos. La letra de los tratamientos representa el tipo de tratamiento (O: ozono y UV: ultravioleta) y el número el tiempo de exposición en minutos. Letras de significación diferentes indican diferencias significativas según test de Tukey a un nivel de significación $\alpha=0,05$.

5.1.3 ANÁLISIS DEL CRECIMIENTO EN BANDEJA DE ALVEOLOS

El ensayo en bandejas de alveolos se llevó a cabo utilizando como tratamientos de UV y ozono los que mejor se habían comportado en el ensayo descrito en el punto anterior realizado en placas Petri, es decir utilizando un tiempo de exposición al UV de 3 minutos y de 5 minutos al ozono. También se evaluó el tratamiento conjunto de ambos: UV (3 min) + Ozono (5 min).

El análisis de varianza mostró que el tratamiento tuvo un impacto significativo en la longitud de la plúmula a los 15 días, tanto en el trigo como en la cebada. Sin embargo, no se observó una influencia significativa de los tratamientos ni en la longitud de la plúmula a los 7 días ni en las mediciones de la raíz para ambas especies (tabla 5.4).

Tabla 5.4: información estadística del ANOVA de una vía (grados de libertad, estadístico *F* y *P*-valor), correspondiente a la influencia del tratamiento en la longitud de radícula, longitud de plúmula y peso radícula de las plántulas de trigo y cebada.

Parámetro analizado	Grados de libertad	Estadístico (<i>F</i>)	<i>P</i> -valor
Longitud plúmula trigo 7 días	3	2,00	0,128
Longitud plúmula trigo 15 días	3	2,83	0,049
Peso raíz trigo	3	2,09	0,115
Longitud plúmula cebada 7 días	3	1,81	0,159
Longitud plúmula cebada 15 días	3	4,03	0,013
Peso raíz cebada	3	0,09	0,963

Al analizar las diferencias entre los diferentes tratamientos aplicados en la semilla de trigo, a pesar de que ninguno mostró diferencias significativas en comparación con el control (figura 5.5), se observó una cierta tendencia al aumento en la longitud de la plúmula en los tratamientos con UV y el tratamiento combinado, tanto a los 7 como a los 15 días. La única diferencia significativa, según el test de Tukey, se produjo a los 15 días, donde el tratamiento combinado UV + ozono produjo una longitud de plúmula significativamente mayor, en comparación con el tratamiento con ozono (figura 5.5).

La longitud de plúmula de las plántulas de cebada a los 7 y 15 días tratadas con UV (tabla 5.6) mostró una cierta tendencia a aumentar. No obstante, el test de Tukey no reveló diferencias significativas entre los diferentes tratamientos, ni en comparación con el control.

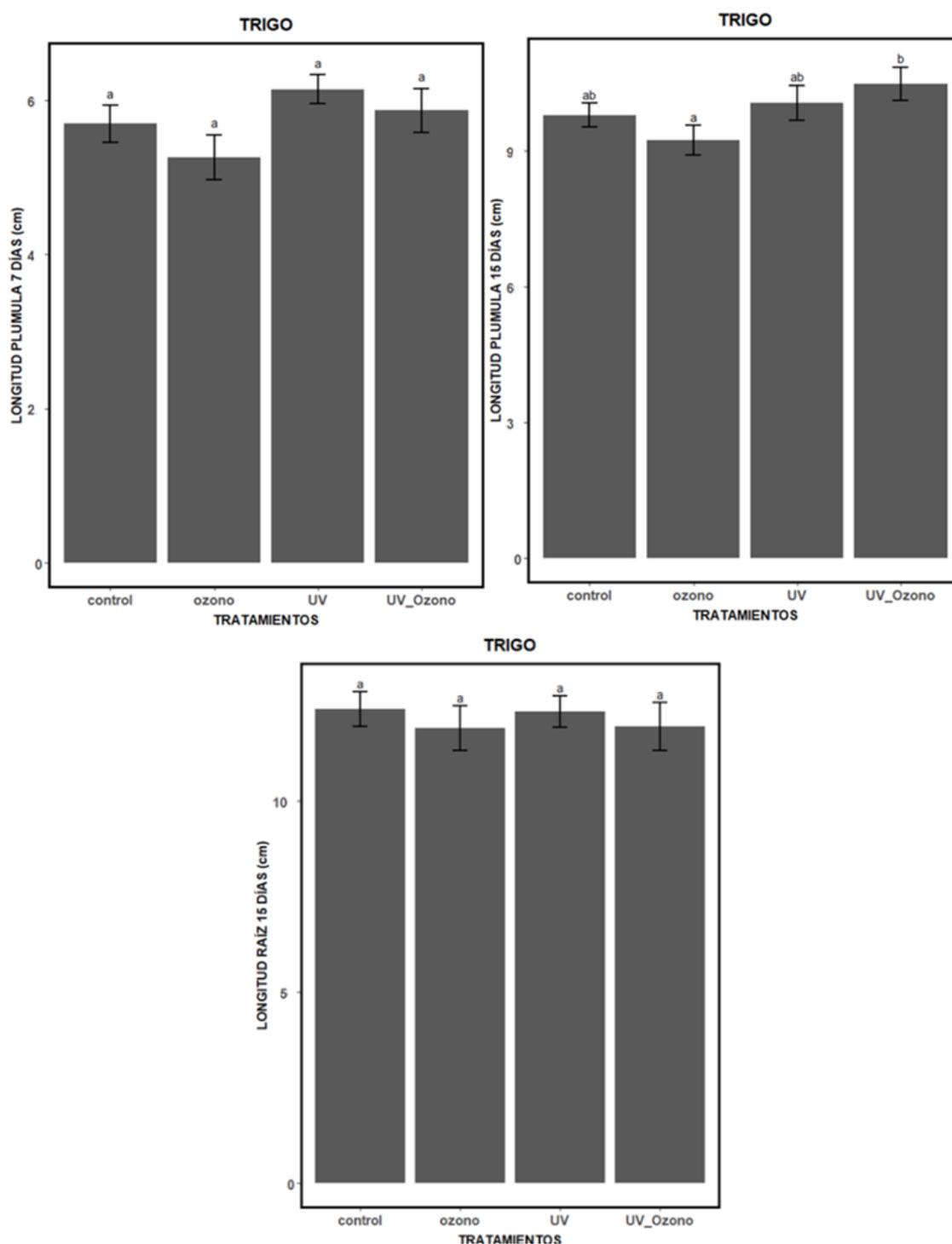


Figura 5.5: longitud de plúmula a los 7 días (superior Izquierda) y 15 días (superior derecha) y longitud de raíz a los 15 días (Inferior) de las plántulas de trigo con los diferentes tratamientos (las barras representan la media y las líneas de error, el error estándar). Letras de significación diferentes indican diferencias significativas según test de Tukey a un nivel de significación $\alpha=0,05$.

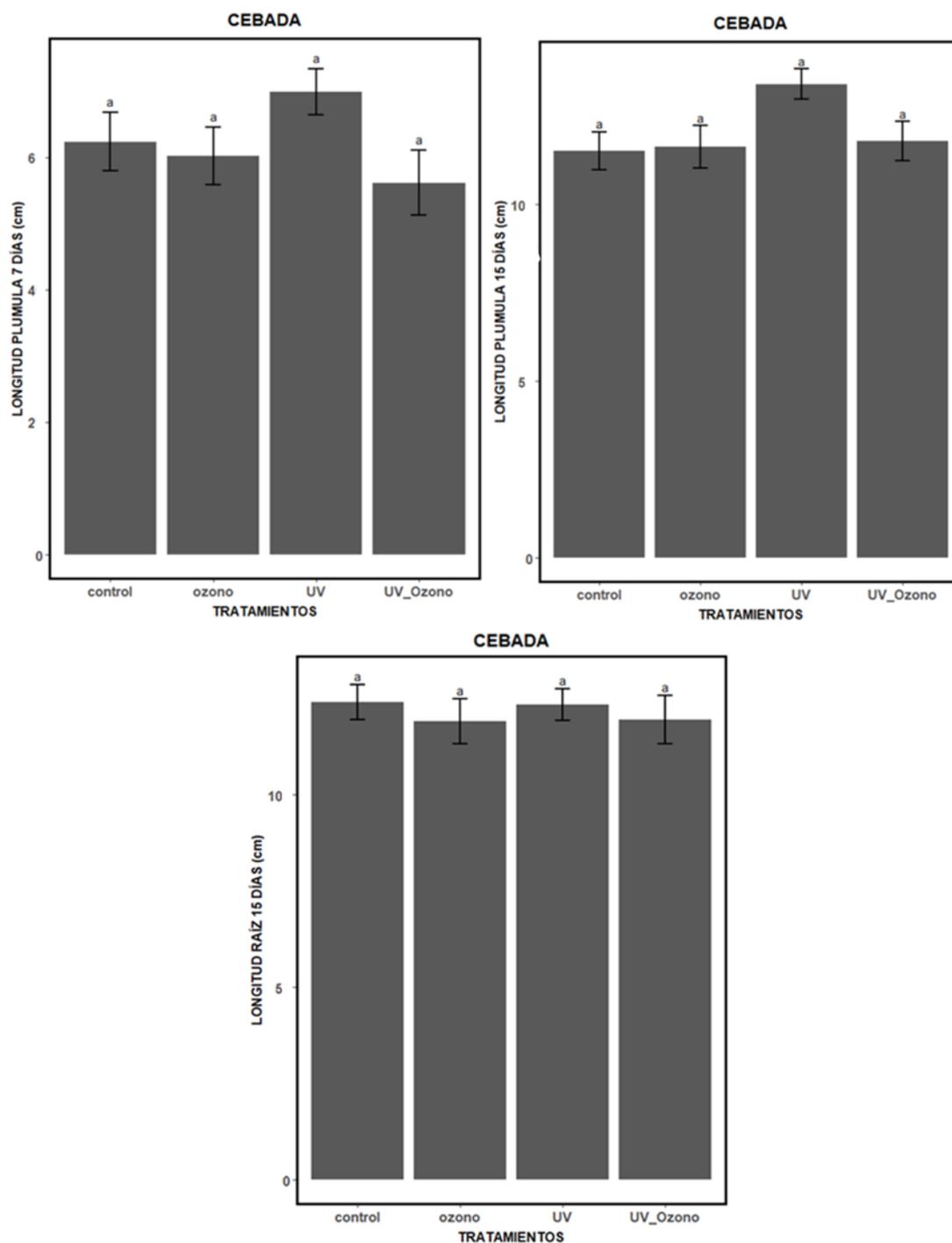


Figura 5.6: longitud de plúmula a los 7 días (superior Izquierda) y 15 días (superior derecha) y longitud de raíz a los 15 días (Inferior) de las plántulas de cebada con los diferentes tratamientos (las barras representan la media y las líneas de error, el error estándar). Letras de significación diferentes indican diferencias significativas según test de Tukey a un nivel de significación $\alpha=0,05$.

5.2 NUTRIPRIMING

En este apartado se presentarán los resultados obtenidos a través de la implementación del método descrito en la sección de metodología. El objetivo de este estudio fue evaluar el impacto de diferentes tratamientos *priming* (Fe, Zn y B) en la germinación y crecimiento de plántulas de trigo y cebada, en condiciones de laboratorio, tanto en placa Petri como en bandeja de alveolos.

5.2.1 ANÁLISIS DE GERMINACIÓN EN PLACA PETRI

En el ensayo de germinación tanto para el trigo como para la cebada, el test chi cuadrado no mostró diferencias significativas, por tanto los tratamientos no influyeron en el % de germinación (tablas 5.5). En todos los casos, estos porcentajes se mantuvieron por encima del 85%

Tabla 5.5: porcentaje de germinación de las semillas de trigo y cebada a los 7 días en función de los diferentes tratamientos. El número incluido en el nombre del tratamiento representa la concentración de cada mineral en la solución. Se incluye también un resumen (grados de libertad: gl; estadístico χ^2 y el *p*-valor) del test Chi cuadrado realizado.

Tratamiento	% Germinación trigo	% Germinación cebada
<i>Hidropriming</i> *	100	96,67
Fe 5000 mg/L	90	100
Fe 500 mg/L	96,67	90
Fe 50 mg/L	96,67	96,67
Zn 5000 mg/L	90	86,67
Zn 500 mg/L	100	96,67
Zn 50 mg/L	86,67	100
B 1000 mg/L	93,33	100
B 100 mg/L	100	93,33
B 10 mg/L	100	96,67
gl	9	9
Estadístico χ^2	15,285	12,946
<i>P</i> -valor	0,083	0,165

* El designado como *hidropriming* puede ser considerado el tratamiento control, ya que se realizó todo el proceso igual pero solo con agua destilada sin contener ningún nutriente.

5.2.1 ANÁLISIS DE CRECIMIENTO EN PLACA PETRI

En lo respectivo a las mediciones biométricas realizadas a los 7 días, el test ANOVA (tabla 5.5), mostró que la variable tratamiento ha afectado significativamente ($P < 0,05$) a todos los parámetros estudiados.

Tabla 5.5: información estadística del ANOVA de una vía (grados de libertad, estadístico F y P -valor), correspondiente a la influencia de la variable tratamiento en la longitud de radícula, longitud de plúmula y peso radícula de las plántulas de trigo y cebada a los 7 días.

Parámetro analizado	Grados de libertad	Estadístico (F)	P -valor
Peso radícula trigo	9	6,30	<0,001
Peso plúmula trigo	9	3,49	0,010
Longitud plúmula trigo	9	11,76	<0,001
Peso radícula cebada	9	4,63	0,022
Peso plúmula cebada	9	6,78	<0,001
Longitud plúmula cebada	9	9,96	<0,001

En trigo, se observó una tendencia de mejora en todos los parámetros medidos (peso plúmula, peso radícula y longitud de plúmula) a los 7 días, por parte de los tratamientos intermedios para los tres nutrientes (figura 5.7). No obstante, el análisis realizado mediante el test de Tukey no reveló diferencias significativas entre los tratamientos y el grupo de control. La variable concentración sí que mostró diferencias significativas dentro de cada nutriente, las concentraciones intermedias de Fe y Zn resultaron significativamente superiores en peso radicular y longitud de plúmula en comparación con el resto de nutrientes.

En el caso de la cebada, no se observó una tendencia tan clara de mejora de los tratamientos intermedios en la longitud y peso de plúmula, así como el peso de radícula, como se muestra en la figura 5.8. El mejor resultado se obtuvo con el tratamiento intermedio con Fe, que aumentó significativamente los resultados, tanto con el control tratado con *hidropriming*, como con muchos de los otros tratamientos, especialmente en los parámetros de longitud y peso de plúmula.

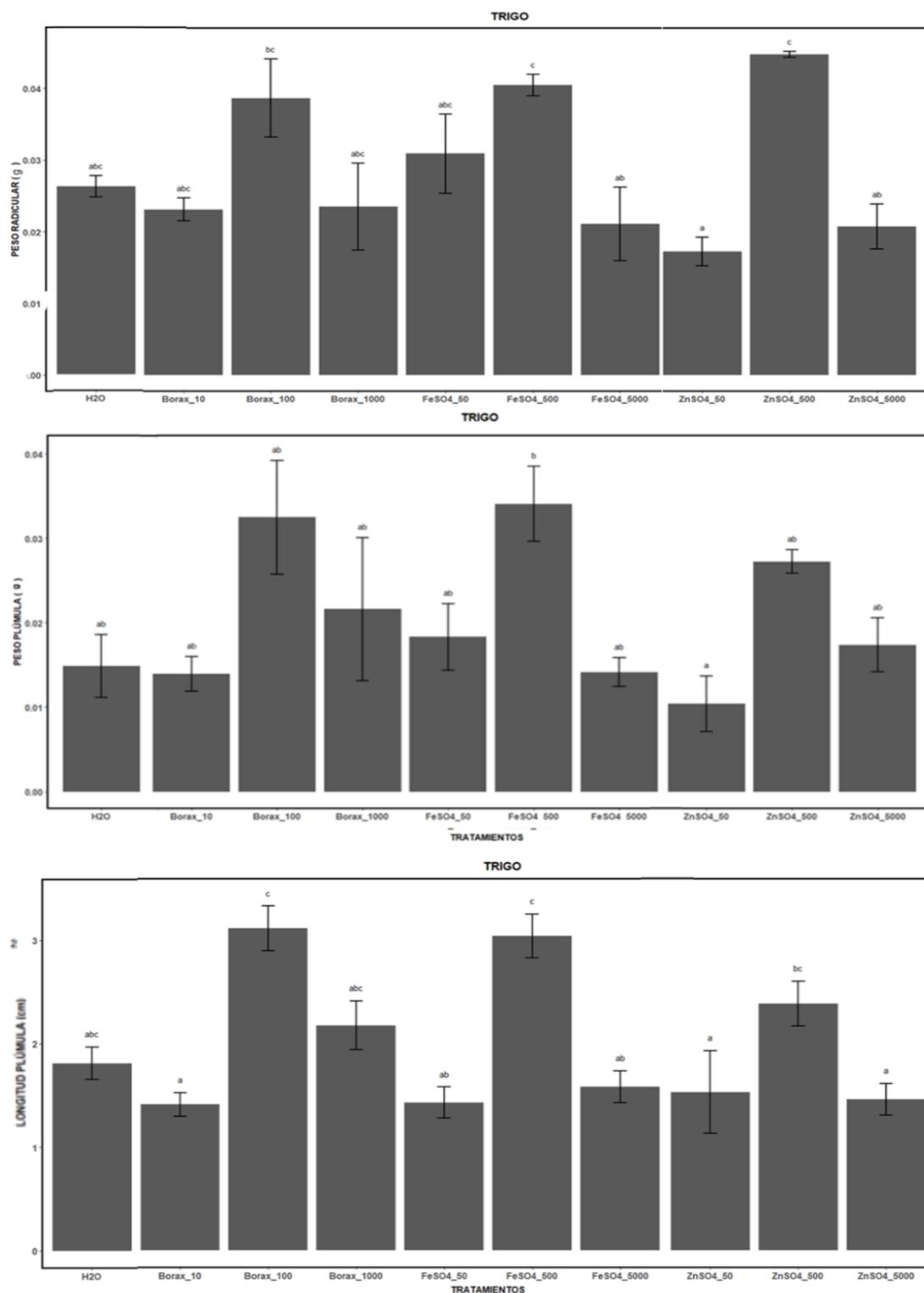


Figura 5.7: Peso radicular (superior), peso plúmula (central) y longitud plúmula (inferior) a los 15 días de las plántulas de trigo con los diferentes tratamientos (las barras representan la media y las líneas de error, el error estándar). El número indicado en los diferentes tratamientos representa la concentración del nutriente en mg/L. Letras de significación diferentes indican diferencias significativas según test de Tukey a un nivel de significación $\alpha=0,05$

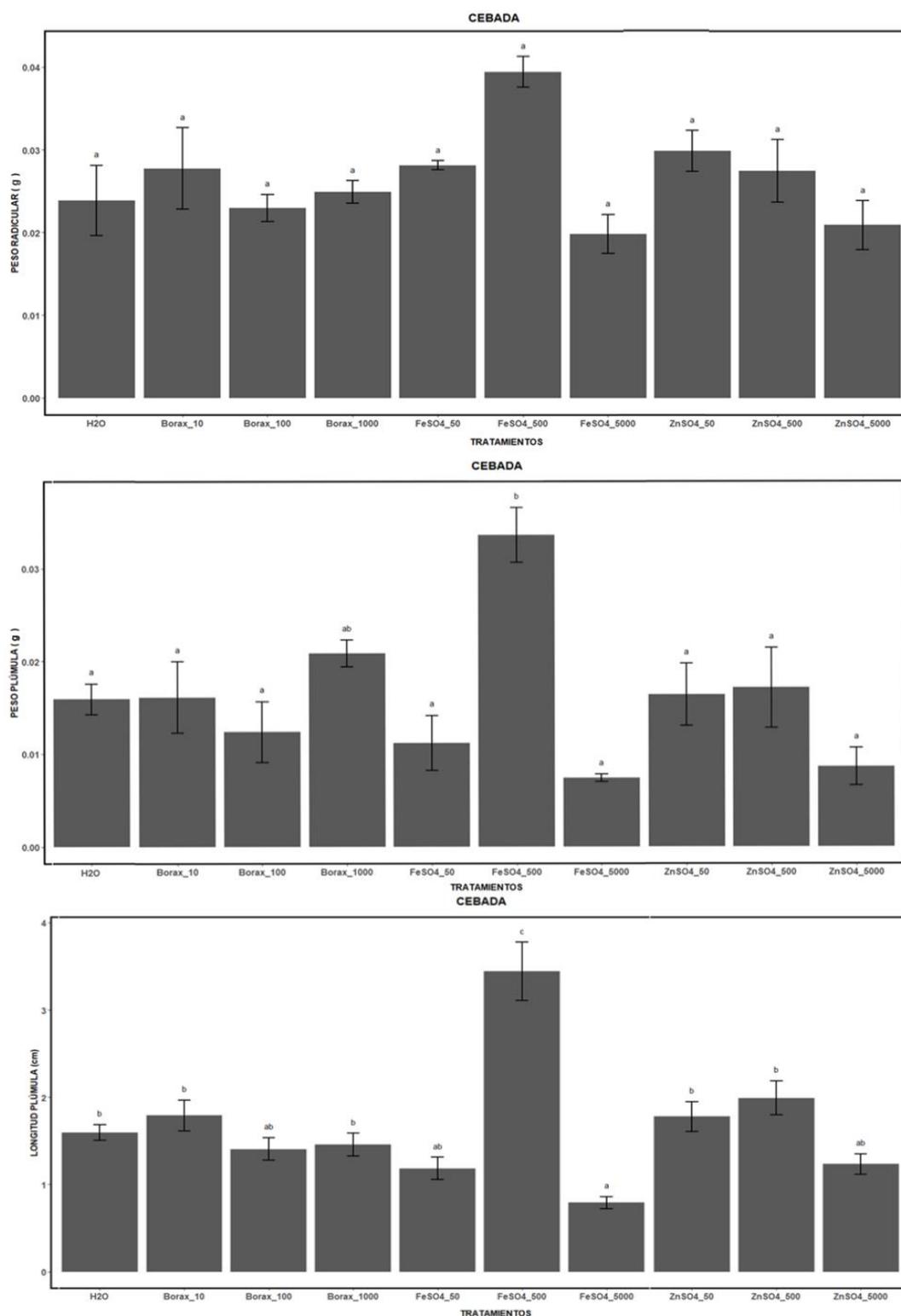


Figura 5.8: Peso radicular (superior), peso plúmula (central) y longitud plúmula (inferior) a los 15 días de las plántulas de cebada con los diferentes tratamientos (las barras representan la media y las líneas de error, el error estándar). El número indicado en los diferentes tratamientos representa la concentración del nutriente en mg/L. Letras de significación diferentes indican diferencias significativas según test de Tukey a un nivel de significación $\alpha=0,05$

5.2.2 ANÁLISIS DE CRECIMIENTO EN BANDEJA DE ALVEOLOS

Los mejores resultados obtenidos en placa del ensayo anterior fueron elegidos para el ensayo en bandeja de alveolos. Por ellos, en este ensayo, se utilizaron los tratamientos intermedios de cada nutriente tanto para trigo como para cebada. Además, se llevó a cabo el ensayo en dos condiciones hídricas, con riego a capacidad de campo y con riego deficitario. El control corresponde con el tratamiento realizado con la técnica *Hidropriming*.

5.2.2.1 Bandejas a capacidad de campo

En el ensayo en bandejas, en condiciones de capacidad de campo, el análisis ANOVA (tabla 5.6) mostró que la variable tratamiento influyó significativamente en algunas características biométricas de las plántulas. El peso de radícula a los 13 días se vio influenciado significativamente por el tratamiento, tanto en trigo como en cebada, al igual que la longitud de la plúmula en cebada, tanto a los 6 como a los 13 días (tabla 5.6).

Tabla 5.6: información estadística del ANOVA de una vía (grados de libertad, estadístico F y P -valor), correspondiente a la influencia de la variable tratamiento en la longitud de radícula, longitud de plúmula y peso radícula de las plántulas de trigo y cebada, en condiciones de riego a capacidad de campo.

Parámetro analizado	Grados de libertad	Estadístico (F)	P -valor
Peso radícula trigo a los 13 días	3	4,96	0,004
Peso plúmula trigo a los 13 días	3	0,17	0,916
Longitud plúmula trigo a los 6 días	3	1,61	0,205
Longitud plúmula trigo a los 13 días	3	0,62	0,606
Peso radícula cebada a los 13 días	3	11,61	<0,001
Peso plúmula cebada a los 13 días	3	1,59	0,2
Longitud plúmula cebada a los 6 días	3	4,08	0,015
Longitud plúmula cebada a los 13 días	3	7,11	<0,001

El tratamiento con Zn resultó ser el más eficaz a la hora de aumentar el peso radicular en las plántulas de trigo. Sin embargo, de acuerdo con el test de Tukey, la diferencia en comparación con el grupo de control no fue significativa (figura 5.9).

En cuanto a la cebada, en las mediciones de peso de radícula (figura 5.10), un aumento significativo en la longitud con los tratamientos que incluían B y Fe, en comparación con el grupo de control y el tratamiento con Zn solo el tratamiento con B mostró un incremento significativo en comparación con el control. Los tratamientos con Zn y Fe mostraron una cierta tendencia de mejora en comparación con el control pero no llegó a ser significativo. En la medición a los 13 días, los tres nutrientes aumentaron de forma significativa la longitud de plúmula en comparación con el control.

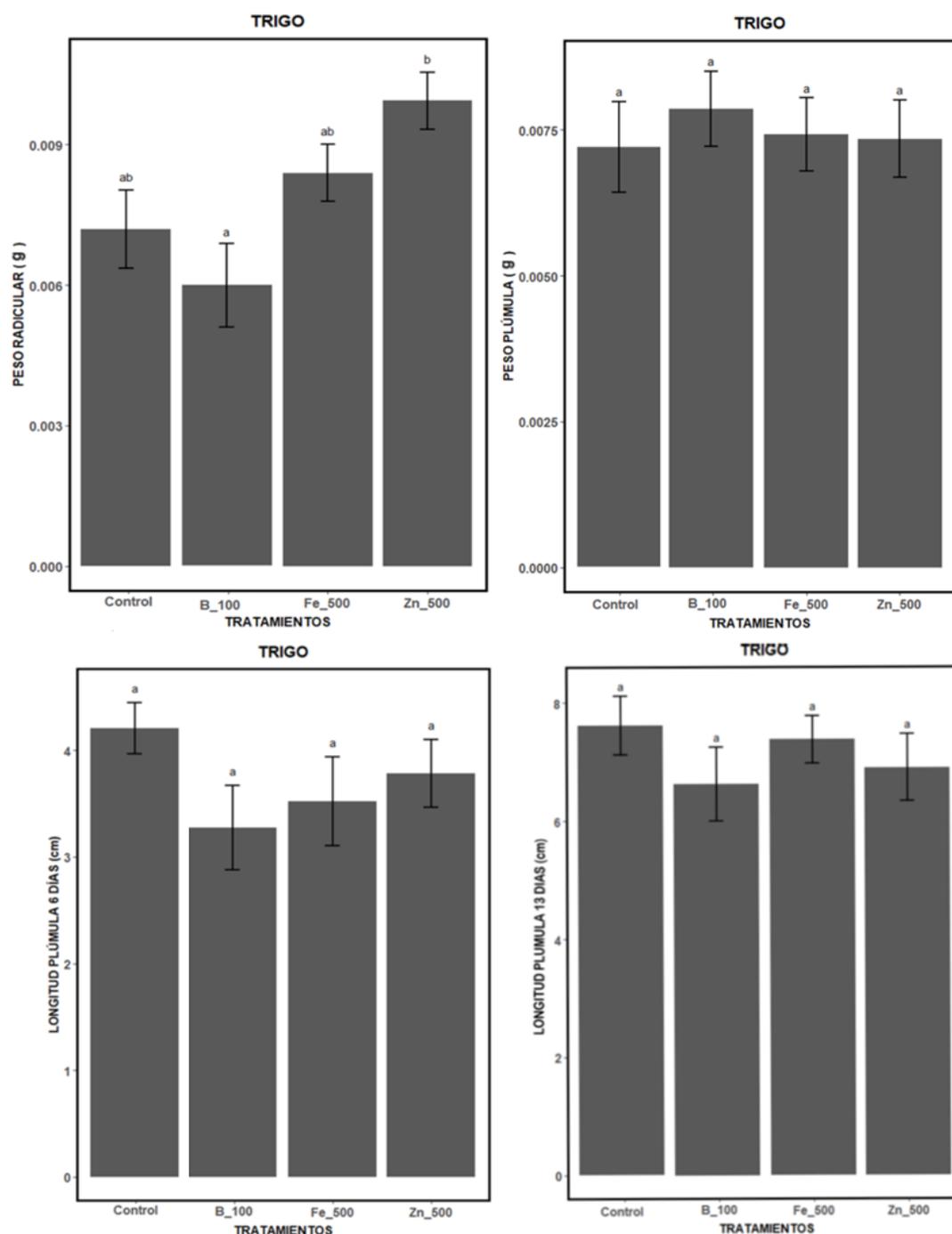


Figura 5.9: peso radicular (superior izquierda) y peso plúmula a los 13 días (superior izquierda) y longitud de plúmula a los 6 (inferior izquierda) y 13 días (inferior derecha) de las plántulas de trigo para los diferentes tratamientos en condiciones de capacidad de campo. Las barras representan la media y las líneas de error, el error estándar. El número indicado en la leyenda de cada tratamiento representa la concentración del nutriente en mg/L. Letras de significación diferentes indican diferencias significativas según test de Tukey a un nivel de significación $\alpha=0,05$.

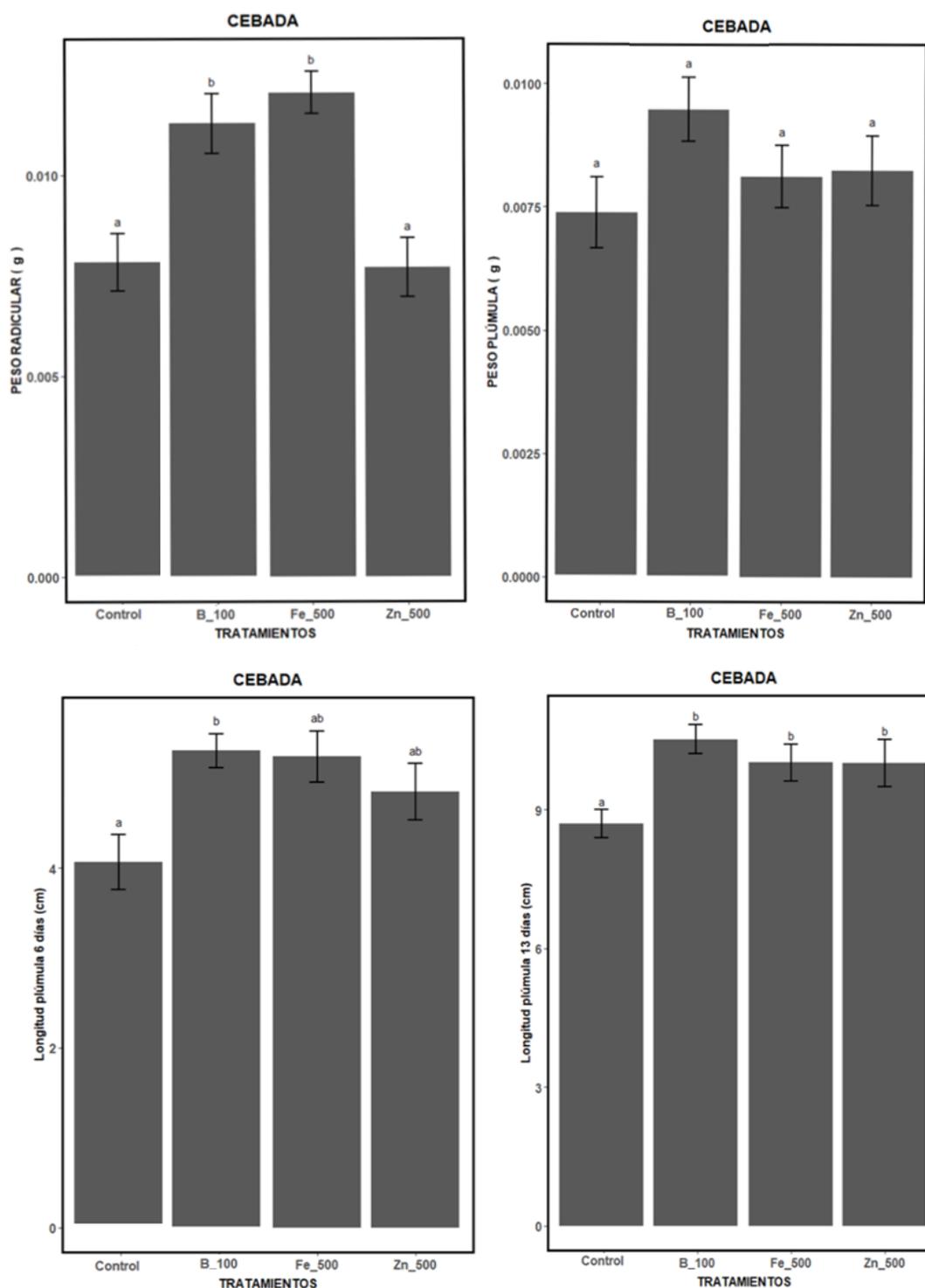


Figura 5.10: peso radicular (superior izquierda) y peso plúmula a los 13 días (superior izquierda) y longitud de plúmula a los 6 (inferior izquierda) y 13 días (inferior derecha) de las plántulas de cebada para los diferentes tratamientos en condiciones de capacidad de campo. Las barras representan la media y las líneas de error, el error estándar. El número indicado en la leyenda de cada tratamiento representa la concentración

del nutriente en mg/L. Letras de significación diferentes indican diferencias significativas según test de Tukey a un nivel de significación $\alpha=0,05$.

5.2.2.2 Bandejas en riego deficitario

El ANOVA efectuado en el ensayo con riego deficitario (tabla 5.7) indicó influencia significativa entre los diferentes tratamientos únicamente en la longitud de la plúmula a los 13 días en el trigo. No se observó influencia significativa en el resto de los parámetros estudiados.

Tabla 5.7: información estadística del ANOVA de una vía (grados de libertad, estadístico F y P -valor), correspondiente a la influencia de la variable tratamiento en la longitud de radícula, longitud de plúmula y peso radícula de las plántulas de trigo y cebada, a los 6 y 13 días, en condiciones de riego deficitario.

Parámetro analizado	Grados de libertad	Estadístico (F)	P -valor
Peso radícula trigo a los 13 días	3	0,191	0,902
Peso plúmula trigo a los 13 días	3	0,393	0,758
Longitud plúmula trigo a los 6 días	3	2,26	0,099
Longitud plúmula trigo a los 13 días	3	3,25	0,035
Peso radícula cebada a los 13 días	3	0,81	0,498
Peso plúmula cebada a los 13 días	3	1,03	0,394
Longitud plúmula cebada a los 6 días	3	0,38	0,765
Longitud plúmula cebada a los 13 días	3	0,32	0,809

En trigo, (figura 5.11), el test de Tukey no reveló diferencias significativas entre tratamientos en ninguno de los parámetros analizados, a pesar de que el ANOVA sí mostró diferencias significativas en la longitud de la plúmula a los 13 días. No obstante, los tres nutrientes exhibieron una tendencia hacia el aumento de la longitud de la plúmula a los 6 días en comparación con el grupo de control. A los 13 días, esta tendencia se repitió, especialmente con el tratamiento de Zn, cuya media mostró una marcada diferencia con respecto al grupo de control, aunque no alcanzó significación estadística (figura 5.11).

En relación con la cebada (figura 5.12), aunque no se observaron diferencias significativas entre los diferentes tratamientos, en ninguno de los parámetros evaluados, en el peso de la plúmula si se notó una tendencia de mejora por parte del tratamiento con Zn.

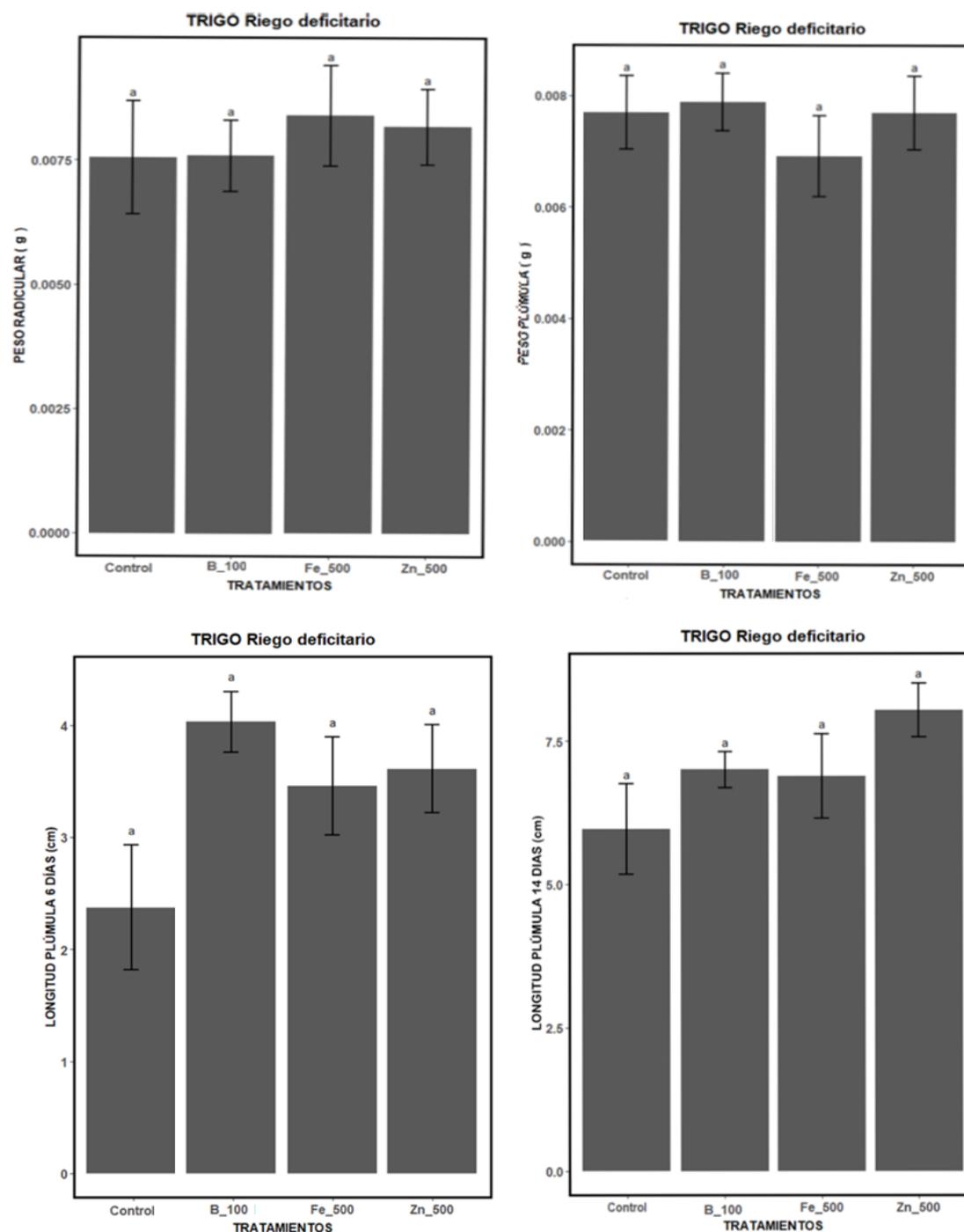


Figura 5.11: peso radicular (superior izquierda) y peso plúmula a los 13 días (superior izquierda) y longitud de plúmula a los 6 (inferior izquierda) y 13 días (inferior derecha) de las plántulas de trigo para los diferentes tratamientos en condiciones de riego deficitario. Las barras representan la media y las líneas de error, el error estándar. El número indicado en la leyenda de cada tratamiento representa la concentración del nutriente en mg/L. Letras de significación diferentes indican diferencias significativas según test de Tukey a un nivel de significación $\alpha=0,05$

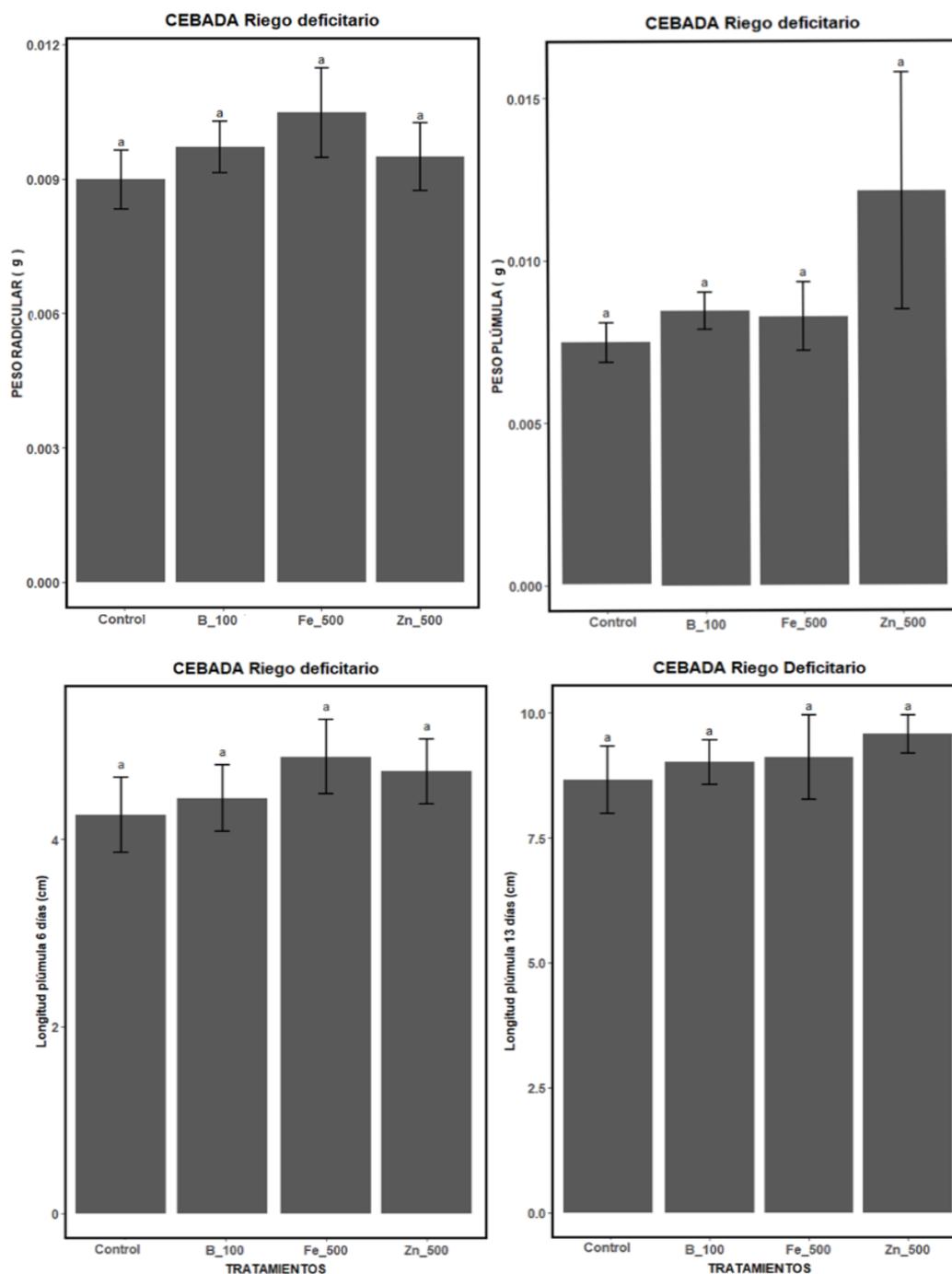


Figura 5.12: peso radicular (superior izquierda) y peso plúmula a los 13 días (superior izquierda) y longitud de plúmula a los 6 (inferior izquierda) y 13 días (inferior derecha) de las plántulas de cebada para los diferentes tratamientos en condiciones de riego deficitario. Las barras representan la media y las líneas de error, el error estándar. El número indicado en la leyenda de cada tratamiento representa la concentración del nutriente en mg/L. Letras de significación diferentes indican diferencias significativas según test de Tukey a un nivel de significación $\alpha=0,05$

5.2.3 ANÁLISIS DE MICRONUTRIENTES EN SEMILLA

El análisis de micronutrientes mostró, tanto en trigo (tabla 5.8), como en cebada (tabla 5.9), que a medida que aumentamos la concentración de un nutriente en los tratamientos *nutripriming* la concentración de este nutriente en el grano aumentó considerablemente.

Tabla 5.8: concentraciones en la semilla de trigo de los nutrientes utilizados tras su aplicación, con las diferentes dosis de aplicación, determinado con un ICP-MS.

Tratamiento	B (µg/g)	Fe (µg/g)	Zn (µg/g)
Control	1,73	32,9	19,3
Fe 5000 mg/L	0,9	437	19,2
Fe 500 mg/L	0,76	89,3	19,4
Fe 50 mg/L	0,94	37,6	21,5
Zn 5000 mg/L	1,39	32,7	>500
Zn 500 mg/L	1,09	29,2	94,7
Zn 50 mg/L	1,19	30,4	25,6
B 1000 mg/L	35,6	31,5	20,6
B 100 mg/L	6,7	37	22,1
B 10 mg/L	2,16	33,5	19,7

Tabla 5.9: concentraciones en la semilla de cebada de los nutrientes utilizados tras su aplicación, con las diferentes dosis de aplicación, determinado con un ICP-MS.

Tratamiento	B (µg/g)	Fe (µg/g)	Zn (µg/g)
Control	0,68	30,7	18,2
Fe 5000 mg/L	0,65	452	17,6
Fe 500 mg/L	0,67	105	18,6
Fe 50 mg/L	0,59	36	20,2
Zn 5000 mg/L	0,67	32,4	>500
Zn 500 mg/L	0,75	27,8	95,8
Zn 50 mg/L	0,83	29,3	28,1
B 1000 mg/L	40,4	31,7	18,7
B 100 mg/L	4,86	26,6	16,9
B 10 mg/L	1,5	28,6	17,8

6. DISCUSIÓN

6.1 UV Y/O OZONO

Se exploraron los efectos estimulantes de la radiación UV y la exposición al ozono en la germinación, así como en la longitud de plúmula y radícula de las semillas de trigo y cebada, primero en placa Petri y luego en bandejas de alveolos. Dado que estas dos técnicas son relativamente novedosas, la disponibilidad de investigaciones similares es limitada, lo que complicó la búsqueda de similitudes y diferencias con estudios previos en el análisis comparativo de resultados.

Los resultados obtenidos en placa Petri mostraron que los tratamientos con radiación UV y ozono no resultaron en un mayor porcentaje de germinación en comparación con el control, tanto en trigo como en cebada. Las únicas diferencias significativas se encontraron en los tratamientos de 1 minuto de exposición a rayos UV y 15 minutos de ozono, los cuales mostraron tasas de germinación inferiores al control. Sin embargo, como no se empleó la dosis más alta en estos tratamientos, carece de sentido que hayan influido en el porcentaje de germinación. Es posible que factores externos o circunstancias casuales hayan interferido en la tasa de germinación ya que si estos tratamientos fueran perjudiciales, se esperaría que las tasas más bajas se observaran en las dosis máximas.

Por tanto, podemos inferir que el tratamiento UV no ha tenido efectos significativos sobre la germinación, lo cual concuerda con la investigación de Foroughbakhch et al. (2019), donde tampoco se encontraron diferencias entre el grupo control y los tratamientos con UV. Sin embargo, esto se contradice con el estudio de Sudhakar et al. (2011), que reportó una mejora en el porcentaje de germinación con tratamientos con ozono.

En cuanto a las mediciones biométricas de plúmula y radícula en placa Petri, en el caso del trigo, el tratamiento con ozono mostró resultados muy prometedores, ya que prácticamente duplicó el crecimiento radicular. En el caso de la cebada casi todos los tratamientos UV y ozono, mejoraron significativamente la longitud de radícula, en comparación con el testigo. No obstante, es necesario contrastar estos datos con los obtenidos en bandejas de alveolos.

La utilización de un amplio rango de dosis proporciona la ventaja de identificar tanto la dosis mínima a partir de la cual se observan mejoras como la dosis a partir de la cual los resultados comienzan a volverse menos favorables. En este sentido, se esperaba que las gráficas mostraran una forma convexa, pero los resultados reflejaron valores muy dispersos, en lugar de esta curva. Esta discrepancia dificulta la determinación precisa de cuándo los resultados empeoran o mejoran en relación con la dosis utilizada, quizá se deberían haber elegido rangos de dosis más amplios para poder establecer la dosis letal.

Es relevante mencionar que, tanto en trigo como en cebada, se observaron errores estándar significativamente elevados, lo que indica que las mediciones presentaron variabilidades importantes entre las plántulas. Esto pudo hacer que muchas de las diferencias observadas, no lo hayan sido a nivel estadístico. En futuros ensayos, convendría por tanto ampliar el número de réplicas a analizar para conseguir bajar dichos errores estándar.

En el conjunto de las variables analizadas en el ensayo de bandejas, ninguno de los tratamientos demostró ser completamente efectivo en comparación con el control, ya que ninguno mejoró ninguna característica significativamente respecto al control. En el caso de los tratamientos UV, los datos concuerdan con investigaciones previas realizadas por Foroughbakhch et al. (2019) y Kondrateva et al. (2020), donde no se observaron mejoras en el tamaño de las plántulas de trigo con tratamientos de UV-C. Sin embargo, estos resultados no concuerdan con la publicación de Sadeghianfar et al. (2019), en la que se encontraron mejoras significativas en el tamaño de las radículas de maíz con tratamientos de UV-C. También contradicen los hallazgos de Neelamegam et al. (2015) y Siddiqui et al. (2011), que revelaron un aumento en el tamaño de las plántulas de cacahuete con exposición a radicación UV-C. No obstante al tratarse de otras especies, es difícil realizar comparaciones. Por último, es importante destacar las investigaciones en trigo que contradicen los datos de este estudio, como los trabajos de Semenov et al. (2020) y Tertyshanya et al. (2018), que encontraron mejoras en tamaño y peso de las plántulas de trigo. Esta contradicción puede haber sido provocada debido a cambios en el procedimiento experimental. En el caso de Semenov et al. (2020) se empleó una dosis de radiación UV-C casi el doble de la utilizada en este estudio y Tertyshanya et al. (2018) utilizó una longitud de onda diferente, concretamente UV-A. Estas diferencias en el

método provocan la necesidad de tomar precauciones a la hora de comparar los resultados, ya que los cambios en los procedimientos experimentales pueden influir significativamente en los resultados observados.

En lo que respecta al ozono, los resultados obtenidos contradicen los de Violleau et al. (2007), en los cuales se observaron mejoras significativas en el tamaño de las raíces de las plántulas de maíz. En cambio, los resultados de este estudio concuerdan con autores como Luzukin et al. (2018), quienes no encontraron mejoras significativas con tratamientos de ozono en el trigo. Por tanto, la mejora significativa del tamaño de radícula observada en el ensayo en placa Petri, no se replicó en el ensayo de bandejas. Sin embargo, teniendo en cuenta que varios autores mencionados anteriormente obtuvieron resultados positivos, se sugiere la necesidad de profundizar en esta investigación a través de nuevos ensayos. Estos futuros experimentos podrían involucrar la utilización de nuevos cultivos o incluso cultivares diferentes, ya que la investigación realizada por Semenov et al. (2020) insinúa que los cultivares desempeñan un papel crucial en la respuesta de las semillas a los tratamientos. En consecuencia, es plausible que investigaciones posteriores que utilicen cultivares distintos puedan lograr mejoras en los parámetros analizados.

La elección de aplicar tratamientos de radiación UV y ozono se basó en la teoría de que la interacción de las ROS generadas por estos tratamientos podría inducir una señal hormonal positiva en las semillas, como se ha sugerido en investigaciones anteriores (El-Maarouf-Bouteau y Bailly, 2008). Sin embargo, esta investigación no respalda esta hipótesis, estando en consonancia con el estudio de Luzukin et al. (2018), que indica que los ROS no desempeñan un papel relevante en el control hormonal y, por lo tanto, no mejoran ningún parámetro germinativo.

6.2 *NUTRIPRIMING*

Se realizaron diversas mediciones biométricas con el propósito de investigar el efecto de los tratamientos de *nutripriming* con Fe, Zn y B, inicialmente en placas Petri y posteriormente en bandejas, tanto en trigo como en cebada.

Es crucial destacar que, debido a la relativa novedad de los tratamientos de *nutripriming*, la cantidad de investigaciones similares es limitada, especialmente en cebada, lo que ha complicado el análisis comparativo en profundidad.

En el ensayo en placa Petri, el objetivo principal era identificar qué concentración de las tres utilizadas para cada nutriente mostraba mejor respuesta, con el fin de utilizar esa concentración en las posteriores pruebas en bandeja de alvéolos. En cuanto a la germinación no se encontraron diferencias significativas en el % de germinación por lo que las concentraciones utilizadas en los tratamientos no han influido en este parámetro. Esto concuerda con varios estudios como Choudhary et al. (2021) en trigo o Sadeghisadeh y Zarea (2022) en cebada que utilizando un procedimiento y dosis similar al de este estudio no encontraron diferencias en el % de germinación. Por otra parte otros autores como Abdulrahmani et al. (2007), observó con dosis más elevadas que las de este estudio, reducción en el % de germinación en cebada. Por tanto se puede intuir que con el procedimiento y los nutrientes utilizados, no se mejora el % de germinación, o por lo menos no de forma muy apreciable, pero hay que tener cuidado con utilizar dosis muy altas ya que estas si que provocan toxicidad reduciendo el % de germinación.

En cuanto a los parámetros biométricos medidos en placa, se pudo observar una cierta mejora por parte de las concentraciones intermedias, sobre todo en trigo, lo que condujo a utilizar estas concentraciones en el ensayo de bandejas

En el ensayo de trigo en bandejas, a pesar de no encontrarse diferencias significativas entre los tratamientos y el control en ambas condiciones de riego, se observaron algunas tendencias de mejora. Concretamente, el tratamiento con zinc en el ensayo a capacidad de campo mostró una tendencia positiva en la medida del peso radicular, con una media notablemente superior al control. En condiciones de riego deficitario, el tratamiento con zinc también mostró una tendencia positiva, esta vez en la longitud de la plúmula. Sin

embargo, estas diferencias no alcanzaron significancia estadística debido a la variabilidad en los resultados obtenidos en las mediciones.

Por lo tanto, este estudio no arrojó resultados similares a investigaciones previas en el cultivo de trigo. Por ejemplo, Choudhary et al. (2021) y Rehman et al. (2015) en trigo, así como Nciiiah et al. (2020) en maíz, lograron mejoras significativas en el tamaño de la plúmula y la raíz mediante tratamientos con Zn. Chakraborty y Bose (2018) y Nciiiah et al. (2020) identificaron mejoras significativas en el tamaño de la plántula, la longitud de la radícula, el peso de la plúmula y el peso de la raíz mediante tratamientos con B en el trigo. Kharb et al. (2023) consiguió mejorar la longitud de la radícula y la plúmula mediante tratamientos con Fe en el arroz en comparación con el *hidropriming*. La posible razón por la cual no se obtuvieron los mismos resultados podría deberse a diferencias en el procedimiento y en el material utilizado. En algunos de los artículos mencionados, no se empleó la misma concentración para cada nutriente, e incluso se recurrió a otra forma química. Además, las semillas se mantuvieron sumergidas durante períodos de tiempo diferentes.

Aunque no se observaron diferencias significativas, sería pertinente llevar a cabo nuevos ensayos, posiblemente utilizando distintas variedades de trigo, para corroborar los resultados obtenidos en este estudio, ya que algunos autores, como Choudhary et al. (2021), al probar técnicas *nutripriming* en dos variedades de trigo, encontraron mejoras en algunas características en una variedad y no en otra.

Respecto a la cebada, se han obtenido mejoras significativas en condiciones de riego a capacidad de campo. Los tratamientos con B y Fe han aumentado el peso radicular, el B mejora la longitud de la plúmula a los 6 días, y los tres tratamientos mejoran la longitud de la plúmula a los 13 días. Estos resultados contrastan con los obtenidos por Atar et al. (2020) y Abdulrahmani et al. (2007) quienes no encontraron mejoras significativas al tratar las semillas de cebada con Zn. Sin embargo, en otros cultivos existen investigaciones que si respaldan los resultados obtenidos en este estudio, como las anteriormente explicadas para el trigo o las investigaciones de Iqbal et al. (2017). En este último estudio, se logró mejorar significativamente el peso de la plántula seca, mediante tratamientos con B, en comparación con el grupo control tratado con *hidropriming*.

En la cebada, bajo condiciones de riego deficitario, no se observaron diferencias estadísticas significativas. La razón detrás de la efectividad de las técnicas *nutripriming* en condiciones de riego normal, en contraste con su falta de efectividad en condiciones de riego deficitario, fue difícil de determinar. Es posible que la limitación principal haya sido la disponibilidad de agua, lo que podría haber restringido el crecimiento de las plántulas. Esto sugiere que las técnicas *nutripriming* estudiadas podrían no haber mejorado la resistencia de las plántulas al estrés hídrico, ya que quizás la posible mejora ante situaciones de estrés hídrico se dé en el caso del crecimiento de la longitud radicular. Esto tiene relación con las investigaciones de autores como Ullah et al. (2019), quienes afirman que los tratamientos con Zn podrían intervenir en el control hormonal, aumentando la longitud de la radícula en las primeras etapas de crecimiento, lo cual no se observó en este ensayo. Sin embargo, para respaldar estas afirmaciones, es esencial continuar investigando en este campo y validar los resultados.

Es importante señalar que ninguno de los tratamientos utilizados en este estudio resultó en disminuciones de los parámetros medidos. Por lo tanto, se descarta la posibilidad de que las concentraciones utilizadas hayan causado algún tipo de toxicidad que reduzca los parámetros germinativos. Esto contrasta con hallazgos en otros estudios, como los de Abdulrahmani et al. (2007) o Iqbal et al. (2017), donde encontraron toxicidad en las plántulas a partir de ciertas dosis. Sin embargo, es relevante destacar que en los estudios donde se observaron esas toxicidades se emplearon concentraciones considerablemente superiores a las utilizadas en esta investigación.

En cuanto al análisis de micronutrientes en la semilla tratada, se obtuvieron los resultados esperados. Se observó claramente cómo la concentración aumentó a medida que se incrementó la dosis, en línea con los hallazgos de Kharb et al. (2023) en su investigación sobre semillas tratadas con Fe, y los resultados de Atar et al. (2020) en trigo y cebada, o Shadeghisadeh y Zarea (2022) en arroz, quienes también lograron aumentar la concentración de Zn con tratamientos *nutripriming*. Esto es importante, ya que, si no se consigue aumentar la concentración de nutrientes, no se lograría el efecto *priming* deseado (Atar et al., 2020). En futuras investigaciones, sería interesante analizar el grano cosechado procedente de semillas tratadas para ver si mejora la concentración de los

nutrientes aplicados, como lo hizo Choukri et al. (2022), que consiguió mejorar la concentración de Zn en el grano de maíz cosechado mediante tratamientos con Zn.

Por lo tanto, es necesario continuar la investigación con un posible ensayo en condiciones de campo para verificar si los resultados obtenidos in vitro se replican in vivo. Al final, lo más crucial es la producción final del cultivo y su capacidad de adaptación a las posibles condiciones adversas que puedan presentarse en el campo.

7. CONCLUSIONES

- 1- Los tratamientos con UV y ozono no evidenciaron efectos sobre la germinación.
- 2- En el ensayo realizado en placa Petri, se observaron mejoras significativas en la longitud de la plúmula y la radícula con el *priming* UV y ozono. Sin embargo, estos beneficios no se replicaron de manera significativa en el ensayo de bandejas
- 3- Los tratamientos *nutripriming* empleados lograron incrementar la concentración de los tres micronutrientes (Zn, B y Fe) en las semillas.
- 4- A pesar del aumento en la concentración de nutrientes, no se observó impacto alguno en el porcentaje de germinación.
- 5- En el trigo, los tratamientos con Zn resultaron en un aumento significativo en el peso radicular. En el caso de la cebada, el B y el Fe mejoraron de manera significativa el peso radicular, y los tres nutrientes tuvieron un impacto positivo significativo en la longitud de la plúmula. La valoración de cuál de los nutrientes es más eficaz se complicó debido a los diferentes resultados observados en las dos especies.
- 6- En el ensayo bajo condiciones de estrés por sequía, no se observaron diferencias significativas entre los tratamientos y el control, posiblemente debido a que la limitación de agua pudo haber frenado el crecimiento de las plántulas.

8. BIBLIOGRAFÍA

- Abadía J, Vázquez S, Rellán-Álvarez R, El-Jendoubi H, Abadía A, Álvarez-Fernández A, López-Millán AF (2011) Towards a knowledge-based correction of iron chlorosis. *Plant Physiol Biochem* 49(5):471–482
- Abdulrahmani, K., Ghassemi-Golezani, K., Valizadeh, M., & Asl, V. F. (2007). Seed priming and seedling establishment of barley (*Hordeum vulgare L.*). *Journal of Food, Agriculture, and Environment*, 5, 179–184.
- Anarbaev, A., Tursunov, O., Kodirov, D., Khudaev, I., Isakhodjayev, K., & Islikov, S. (2021). Pre-sowing activation of seeds by ultraviolet (UV) radiation. *E3S Web Conf.*, 304, 03040. <https://doi.org/10.1051/e3sconf/202130403040>
- Araújo SS, Paparella S, Dondi D, Bentivoglio A, Carbonera, and Balestrazzi A (2016) Physical Methods for Seed Invigoration: Advantages and Challenges in Seed Technology. *Front. Plant Sci.* 7:646. <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.00646>
- Atar, B. , Uygur, V. & Sukuşu, E. (2020). Effects of Priming with Copper, Zinc and Phosphorus on Seed and Seedling Composition in Wheat and Barley . *Türk Tarım ve Doğa Bilimleri Dergisi* , 7 (1) , 104-111 . DOI: 10.30910/turkjans.680021
- Avdeeva, V., Zorina, E., Bezgina, J., & Kolosova, O. (2018). Influence of ozone on germination and germinating energy of winter wheat seeds. *Stavropol State Agrarian University, Russia*. <http://dx.doi.org/10.22616/ERDev2018.17.N128>
- Badridze, G., Kacharava, N., Chkhubianishvili, E., et al. (2016). Effect of UV radiation and artificial acid rain on productivity of wheat. *Russian Journal of Ecology*, 47, 158-166. <https://doi.org/10.1134/S106741361602003X>
- Bartolić, D., Stanković, M., Prokopijević, M., & Radotić, K. (2022). Effects of UV-A and UV-B Irradiation on Antioxidant Activity and Fluorescence Characteristics of Soybean (*Glycine max L.*) Seeds. *Russian Journal of Physical Chemistry A*, 96(12), 2797-2800. <http://dx.doi.org/10.1134/S0036024422120044>

- Bera, K., Dutta, P., & Sadhukhan, S. (2022). Seed priming with non-ionizing physical agents: plant responses and underlying physiological mechanisms. *Plant Cell Reports*, 41, 53–73. <https://doi.org/10.1007/s00299-021-02798-y>
- Brown PH, Cakmak I, Zhang Q (1993) Form and function of zinc plants. In: Zinc in soils and plants. Springer, Dordrecht, pp 93–106
- Chakraborty P, Bose B (2018) Effects of various concentrations of boron on germination, seedling growth of wheat, using boric acid primed seeds. In: National seminar on water and soil management approaches for climate smart agriculture (WASMACS 2018)
- Choudhary, S.K., Kumar, V., Singhal, R.K., Bose, B., Chauhan, J., Alamri, S., Siddiqui, M.H., Javed, T., Shabbir, R., Rajendran, K., et al. (2021). Seed Priming with Mg(NO₃)₂ and ZnSO₄ Salts Triggers the Germination and Growth Attributes Synergistically in Wheat Varieties. *Agronomy*, 11, 2110. <https://doi.org/10.3390/agronomy11112110>
- Comisión Europea. (2016). Decisión de Ejecución (UE) 2016/321 de la Comisión de 3 de marzo de 2016 por la que se adapta el ámbito geográfico de la autorización de cultivo del maíz (*Zea mays* L.) modificado genéticamente MON 810 (MON-ØØ81Ø-6) [notificada con el número C (2016) 1231]
- Comisión Europea. (2019). El Pacto Verde Europeo: De la granja a la mesa. Luxemburgo: Oficina de Publicaciones de la Unión Europea.
- El-Maarouf-Bouteau, H., & Bailly, C. (2008). Oxidative signaling in seed germination and dormancy. *Plant Signaling & Behavior*, 3(3), 175-182. <https://doi.org/10.4161/psb.3.3.5539>
- Farooq, M. A., Zhang, X., Zafar, M. M., Ma, W., & Zhao, J. (2021). Roles of Reactive Oxygen Species and Mitochondria in Seed Germination. *Frontiers in Plant Science*, 12, 781734. <https://doi.org/10.3389/fpls.2021.781734>
- Foroughbakhch Pournavab, R., Bacópulos Mejía, E., Benavides Mendoza, A., Salas Cruz, L., & Ngangyo Heya, M. (2019). "Ultraviolet Radiation Effect on Seed Germination and Seedling Growth of Common Species from Northeastern Mexico." *Agronomy*, 9(6), 269. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/agronomy9060269>

- Gallardo, V., Ruiz, M. A., Parera, A., & Hernández, A. (2000). Radiaciones solares: tipos y efectos. Dpto. de Farmacia y Tecnología Farmacéutica, Facultad de Farmacia, Universidad de Granada.
- Haider, I. et al. (2019). Improving Antioxidant Defense in Plants Through Seed Priming and Seedling Pretreatment. In: Hasanuzzaman, M., Fotopoulos, V. (eds) Priming and Pretreatment of Seeds and Seedlings. Springer, Singapore. https://doi.org/10.1007/978-981-13-8625-1_29
- Halmer P (2004) Methods to improve seed performance in the field. In: Handbook of seed physiology, pp 125–65
- Hansch R, Mendel RR (2009) Physiological functions of mineral micronutrients (Cu, Zn, Mn, Fe, Ni, Mo, B, Cl). *Curr Opin Plant Biol* 12(3):259–266
- Harris, D., Rashid, A., Miraj, G., et al. (2008). 'On-farm' seed priming with zinc in chickpea and wheat in Pakistan. *Plant and Soil*, 306(1-2), 3-10. <https://doi.org/10.1007/s11104-007-9465-4>
- Hasanuzzaman, M., & Fotopoulos, V. (2019). Priming and Pretreatment of Seeds and Seedlings: Implication in Plant Stress Tolerance and Enhancing Productivity in Crop Plants. Springer. <https://doi.org/10.1007/978-981-13-8625-1>
- Hemalatha K, Venkatesan S (2011) Impact of iron toxicity on certain enzymes and biochemical parameters of tea. *Asian J Biochem* 6:384–394
- Hollósy, F. (2002) Effects of Ultraviolet Radiation on Plant Cells. *Micron*, 33, 179-197. [https://doi.org/10.1016/S0968-4328\(01\)00011-7](https://doi.org/10.1016/S0968-4328(01)00011-7)
- Hussain S, Khan F, Cao W, Wu L and Geng M (2016) Seed Priming Alters the Production and Detoxification of Reactive Oxygen Intermediates in Rice Seedlings Grown under Sub-optimal Temperature and Nutrient Supply. *Front. Plant Sci.* 7:439. doi: 10.3389/fpls.2016.00439
- Imran, M., Mahmood, A., Römheld, V., & Neumann, G. (2013). Nutrient seed priming improves seedling development of maize exposed to low root zone temperatures during early

- growth. *European Journal of Agronomy*, 49, 141-148. ISSN 1161-0301. doi: 10.1016/j.eja.2013.04.001.
- IPCC, (2022): *Climate Change 2022: Impacts, Adaptation and Vulnerability. Contribution of Working Group II to the Sixth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change* [H.-O. Pörtner, D.C. Roberts, M. Tignor, E.S. Poloczanska, K. Mintenbeck, A. Alegría, M. Craig, S. Langsdorf, S. Löschke, V. Möller, A. Okem, B. Rama (eds.)]. Cambridge University Press. Cambridge University Press, Cambridge, UK and New York, NY, USA, 3056 pp., doi:10.1017/9781009325844.
- Iqbal S, Farooq M, Nawaz A, Rehman A (2012) Optimizing boron seed priming treatments for improving the germination and early seedling growth of wheat. *J Agric Soc Sci* 8(2):57–61
- Iuliana C, Caprita R, Giancarla V, Sorina R (2013) Response of barley seedlings to microwaves at 2.45 GHz. *Sci Pap Anim Sci Biotechnol* 46:185–191
- Junta de Castilla y León (2023). *Anuario de estadística agraria de Castilla y León 2021*. Valladolid: Junta de Castilla y León.
- Kacharava, N., Chanishvili, Sh. Sh., Chanishvili, Sh. Sh., Badridze, G. Sh., Badridze, G. Sh., & Janukashvili, N. (2009). Effect of seed irradiation on the content of antioxidants in leaves of Kidney bean, Cabbage, and Beet cultivars. *Australian Journal of Crop Science*, 3(3), 137-145.
- Kaur, S., Gupta, A.K. & Kaur, N (2002). Effect of osmo- and hydropriming of chickpea seeds on seedling growth and carbohydrate metabolism under water deficit stress. *Plant Growth Regulation* 37, 17–22 . <https://doi.org/10.1023/A:1020310008830>
- Kells, S. A., Mason, L. J., Maier, D. E., & Woloshuk, C. P. (2001). Efficacy and fumigation characteristics of ozone in stored maize. *Journal of Stored Products Research*, 37(4), 371-382. [https://doi.org/10.1016/s0022-474x\(00\)00040-0](https://doi.org/10.1016/s0022-474x(00)00040-0)
- Kerr, J. B., & McElroy, C. T. (1993). Evidence for large upward trends of ultraviolet-B radiation linked to ozone depletion. *Science*, 262(5136), 1032-1034.

- Kharb, V., Sharma, V., Dhaliwal, S., & Kalia, A. (2023). Influence of iron seed priming on seed germination, growth and iron content in rice seedlings. *Journal of Plant Nutrition*, 46, 1-9. <https://doi.org/10.1080/01904167.2023.2220731>.
- Kondrateva, N.P., Kasatkina, N.I., Kuryleva, A.G., Baturina, K.A., Ilyasov, I.R., & Korepanov, R.I. (2020). Effect of treatment of seeds of grain crops by ultraviolet radiation before sowing. *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*, 433.
- Kumar, V., Singhal, R.K., Kumar, N., Bose, B. (2020). Micro-nutrient Seed Priming: A Pragmatic Approach Towards Abiotic Stress Management. En Rakshit, A., Singh, H., Singh, A., Singh, U., Fraceto, L. (eds.), *New Frontiers in Stress Management for Durable Agriculture* (pp. 243-261). Springer, Singapur. https://doi.org/10.1007/978-981-15-1322-0_14
- López-Rubira, V., Artés-Hernández, F., & Artés, F. (2007). Evaluación de la calidad de granadas tratadas con UVC y almacenadas en atmósfera controlada. En V Congreso Iberoamericano de Tecnología Postcosecha y Agroexportaciones (pp. 137-145).
- Macovei A, Garg B, Raikwar S, Balestrazzi A, Carbonera D, Buttafava A (2014) Synergistic exposure of rice seeds to different doses of γ -ray and salinity stress resulted in increased antioxidant enzyme activities and gene-specific modulation of TC-NER pathway. *Biomed Res Int*170:780–787. <https://doi.org/10.1155/2014/676934>
- McKenzie, K. S., Sarr, A. B., Mayura, K., Bailey, R. H., Miller, D. R., Rogers, T. D., Norred, W. P., Voss, K. A., Plattner, R. D., Kubena, L. F., Phillips, T. D. (1997). Oxidative degradation and detoxification of mycotoxins using a novel source of ozone. *Food and Chemical Toxicology*, 35(8), 807-820. [https://doi.org/10.1016/s0278-6915\(97\)00052-5](https://doi.org/10.1016/s0278-6915(97)00052-5)
- Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación. (2021). ZONAS VULNERABLES A CONTAMINACIÓN POR NITRATOS (Actualización CDE oficial de zonas vulnerables, junio 2021, Dir 91/676/CEE)
- Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación. (2022). Encuesta sobre Superficies y Rendimientos de Cultivos. Madrid.

- Nciizah, A. D., Rapetsoa, M. C., Wakindiki, I. I., & Zerizghy, M. G. (2020). Micronutrient seed priming improves maize (*Zea mays*) early seedling growth in a micronutrient deficient soil. *Heliyon*, 6(8), e04766. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2020.e04766>
- Neelamegam, R. y Sutha, T. (2015). UV-C irradiation effect on seed germination, seedling growth and productivity of groundnut (*Arachis hypogaea* L.). *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, 4, 430–443.
- Noleppa, S., & Carlsburg, M. (2021). The Socio-Economic and Environmental Values of Plant Breeding in the EU and Selected EU Member States. HFFA Research Paper 2021
- Padilla-Cuevas, J., Yee-Madeira, H. T., Merino-García, A., Hidalgo, C., & Etchevers, J. D. (2020). Análisis de los elementos minerales esenciales y tóxicos en tejidos vegetales. *Agrociencia*, 54(3), 413-434. <https://doi.org/10.47163/agrociencia.v54i3.1916>
- Pandiselvam, R., Mayookha, V. P., Kothakota, A., Sharmila, L., Ramesh, S. V., Bharathi, C. P., Gomathy, K., & Srikanth, V. (2020). Impact of Ozone Treatment on Seed Germination – A Systematic Review. *Ozone: Science & Engineering*, 42(4), 331-346. <https://doi.org/10.1080/01919512.2019.1673697>
- Ramos Truchero, G., & Izquierdo Ramírez, B. (2018). La formación en el sector Agroalimentario. Un elemento clave para la sostenibilidad rural. UPA. <https://www.upa.es/upa/noticias-upa/2021/2507/>
- Raza, A., Tahir, M. A., Sabah, N.-U.-S., Shah, S. H., Sarwar, G., & Manzoor, M. Z. (2023). Seed priming with zinc ion on growth performance and nutrient acquisition of maize in aridisols. *Pakistan Journal of Botany*, 55(4), [páginas]. [http://dx.doi.org/10.30848/PJB2023-4\(26\)](http://dx.doi.org/10.30848/PJB2023-4(26))
- Rehman, A., Farooq, M., Ahmad, R., & Basra, S.M.A. (2015). Seed priming with zinc improves the germination and early seedling growth of wheat. *Seed Science and Technology*, 43, 262–268.
- Reis, S., Pavia, I., Carvalho, A. et al. (2018). Seed priming with iron and zinc in bread wheat: effects in germination, mitosis and grain yield. *Protoplasma*, 255(4), 1179–1194. <https://doi.org/10.1007/s00709-018-1222-4>

- Sadeghianfar, P., Nazari, M., & Backes, G. (2019). Exposure to Ultraviolet (UV-C) Radiation Increases Germination Rate of Maize (*Zea mays* L.) and Sugar Beet (*Beta vulgaris*) Seeds. *Plants*, 8(2), 49. MDPI AG. Retrieved from <http://dx.doi.org/10.3390/plants8020049>.
- Salehzade H, Izadkhah Shishvan M, Chiyasi M (2009) Effect of seed priming on germination and seedling growth of wheat (*Triticum aestivum* L.). *J Biol Sci* 4:629–631
- Semenov, A., Korotkova, I., Sakhno, T., Marenych, M., Nanhur, V., Liashenko, V., & Kaminsky, V. (2020). Effect of UV-C radiation on basic indices of growth process of winter wheat (*Triticum aestivum* L.) seeds in pre-sowing treatment. *Acta agriculturae Slovenica*, 116(1), 49–58.
- Sadeghizadeh, M., & Zarea, M.J. (2022). Effects of seed priming with zinc on germination, nursery seedling growth and paddy fields yield of two rice (*Oryza sativa* L.) cultivars. *Journal of Crop Science and Biotechnology*, 25, 313–324. <https://doi.org/10.1007/s12892-021-00133-1>.
- Shao CX, Hu J, Song WJ, Hu WM (2005) Effects of seed priming with chitosan solutions of different acidity on seed germination and physiological characteristics of maize seedling. *J Zhejiang Univ (Agric Life Sci)* 31(6):705–708
- Sher, A., Sarwar, T., Nawaz, A., Ijaz, M., Sattar, A., Ahmad, S. (2019). Methods of Seed Priming. In: Hasanuzzaman, M., Fotopoulos, V. (eds) *Priming and Pretreatment of Seeds and Seedlings*. Springer, Singapore. https://doi.org/10.1007/978-981-13-8625-1_1
- Shine, M.B., Guruprasad, K.N. and Anand, A. (2011), Enhancement of germination, growth, and photosynthesis in soybean by pre-treatment of seeds with magnetic field. *Bioelectromagnetics*, 32: 474-484. <https://doi.org/10.1002/bem.20656>
- Siddiqui, A., Dawar, S., Zaki, M.J., & Hamid, N. (2011). Role of ultra violet (UV-C) radiation in the control of root infecting fungi on groundnut and mung bean.
- Sudhakar, N., Nagendra-Prasad, D., Mohan, N., Hill, B., Gunasekaran, M., & Murugesan, K. (2011). Assessing Influence of Ozone in Tomato Seed Dormancy Alleviation. *American Journal of Plant Sciences*, 2, 443-448. <http://dx.doi.org/10.4236/ajps.2011.23051>

- Tertyshnaya, Yu. V., Levina, N. S., & Elizarova, O. V. (2017). Impact of ultraviolet radiation on germination and growth processes of wheat seeds. *Sel'skokhozyaystvennye mashiny i tekhnologii*, 2, 31-36. DOI 10.22314/2073-7599-2017.2.31-36
- Thomas, T. T. D., & Puthur, J. T. (2017). UV radiation priming: A means of amplifying the inherent potential for abiotic stress tolerance in crop plants. *Environmental and Experimental Botany*, 138, 57-66. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2017.03.003>.
- United Nations Department of Economic and Social Affairs, Population Division. (2022). *World Population Prospects 2022: Summary of Results*. New York: United Nations.
- Urbano Terrón, P. (1995). *Tratado general de fitotecnia* (2a. ed. rev. y ampliada). Madrid: Mundi-Prensa.
- Van Dijk, M., Morley, T., Rau, M. L., & Saghai, Y. (2021). A meta-analysis of projected global food demand and population at risk of hunger for the period 2010–2050
- Violleau, F., Hadjeba, K., Albet, J., Cazalis, R., & Surel, O. (2007). Increase of corn seeds germination by oxygen and ozone treatment. En IOA Conference and Exhibition, Valencia, Spain - October 29–31, 2007 (p. 3.4-1)
- Wu, J., Doan, H., & Cuenca, M. (2006). Investigation of gaseous ozone as an anti-fungal fumigant for stored wheat. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, 81(7), 1085-1090. <https://doi.org/10.1002/jctb.1550>
- Yurekli F, Porgali ZB, Turkan I (2004) Variations in abscisic acid, indole-3-acetic acid, gibberellic acid and zeatin concentrations in two bean species subjected to salt stress. *Acta Bio Cracov Ser Bot* 46:201–212
- Zhang, C. (2014). Essential functions of iron-requiring proteins in DNA replication, repair, and cell cycle control. *Protein & Cell*, 5(10), 750-760.