



# Germinación de semillas de *Lotus tenuis*: efecto del tratamiento pregerminativo, tiempo de almacenamiento y rol de la cubierta dura a largo plazo

Lissarrague, María Isabel<sup>1,3</sup>; Lisandro José Entio<sup>1</sup>; Rodrigo Altamirano<sup>2</sup>; María de la Merced Mujica<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Cátedra Introducción al mejoramiento genético, Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales, Universidad Nacional de La Plata, La Plata, Buenos Aires, Argentina; <sup>2</sup>Cátedra de cálculo estadístico y biometría, Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales, Universidad Nacional de La Plata, La Plata, Buenos Aires, Argentina; <sup>3</sup>[milissarrague@hotmail.com](mailto:milissarrague@hotmail.com)

Lissarrague, María Isabel; Lisandro José Entio; Rodrigo Altamirano; María de la Merced Mujica (2020) Germinación de semillas de *Lotus tenuis*: efecto del tratamiento pregerminativo, tiempo de almacenamiento y rol de la cubierta dura a largo plazo. Rev. Fac. Agron. Vol 119 (1): 1-7. <https://doi.org/10.24215/16699513e043>

Se evaluó el efecto de la escarificación mecánica en dos momentos luego de la cosecha sobre la germinación de semillas de 23 genotipos de *Lotus tenuis* Waldst et Kit almacenadas en condiciones de laboratorio sin escarificar y el rol de las cubiertas duras sobre dicha respuesta a largo plazo. Se usó un DCA con tres factores [genotipos, tratamiento pregerminativo (E=escarificado; NE=ausencia de escarificado) y tiempo de almacenamiento (t1=0,25 años; t2=22,5 años)] (n=4). Se calculó el porcentaje de germinación acumulada (Gac%) y de semillas duras (Sd%). Para t2 se calculó el índice de velocidad germinativa (IVG). Se aplicó ANOVA no paramétrico (Kruskal-Wallis) y comparación de medianas. Para t2 se analizaron correlación y regresión simple. La interacción triple resultó significativa ( $p \leq 0,01$ ) para ambos parámetros. Gac% tuvo valores mayores en el tratamiento E en t1 y menores en NE en t2. El factor genotipo resultó significativo ( $p \leq 0,01$ ) para el E en t2. Sd% tuvo valores mayores en el tratamiento NE en t1 y menores en E independientemente del tiempo de almacenamiento. El factor genotipo resultó significativo ( $p \leq 0,01$ ) para NE en t2. La correlación Sd% vs. Gac% e IVG resultó significativa ( $p \leq 0,01$ ) y positiva. Las regresiones simples Sd% vs. Gac% e IVG resultaron significativas ( $p \leq 0,01$ ). El estudio demostró que la escarificación y el tiempo de almacenamiento afectan de manera positiva y negativa, respectivamente, al comportamiento germinativo de los genotipos estudiados, que el ablandamiento de la cubierta dura es variable entre genotipos y que dicha cubierta estaría vinculada con la conservación de la capacidad germinativa en el largo plazo.

**Palabras clave:** especies forrajeras, leguminosas, germinación, conservación de semillas, semillas duras

Lissarrague, María Isabel; Lisandro José Entio; Rodrigo Altamirano; María de la Merced Mujica (2020) Seed germination of *Lotus tenuis*: effect of pregerminative treatment, storage period and the role of the hard cover in the long term. Rev. Fac. Agron. Vol 119 (1): 1-7. <https://doi.org/10.24215/16699513e043>

It was evaluated the effect of the mechanical scarification in two moments after harvest in the seed germination response of 23 genotypes of *Lotus tenuis* Waldst et Kit stored under laboratory conditions without scarification and the role of the hard covers on this response. A complete random design with three factors was used [genotypes, pregerminative treatment (E=scarified; NE=non-scarified) and storage period (t1=0.25 years; t2=22.5 años)] (n=4). The percentages of cumulative germination (Gac%) and of hard seeds (Sd%) were calculated. In t2, germination speed index (IVG) was calculated. A non-parametric ANOVA (Kruskal-Wallis) and comparison of medians were applied. In t2, correlation and regression simple were analyzed. The triple interaction was significant ( $p \leq 0,01$ ) for both parameters. Gac% had higher values in the treatment E in t1 and lower values in treatment NE in t2. The factor genotype was significant ( $p \leq 0,01$ ) for the treatment E in t2. Sd% had higher values in the treatment NE in t1 and lower values in the treatment E regardless the storage period. The factor genotype was significant ( $p \leq 0,01$ ) for the treatment NE in t2. The correlations Sd% vs. Gac% and IVG were significant ( $p \leq 0,01$ ) and positives. Simple regressions SD% vs. Gac% and Sd% vs. IVG were significant ( $p \leq 0,01$ ). This study showed that scarification and storage period affect positively and negatively, respectively, the germinative behavior of the studied genotypes, that the softening of the hard cover is variable among genotypes, and that these hard cover would be linked to the preservation of the germinative capacity in the long term.

**Key words:** forages species, legumes, germination, seed conservation, hard seed

<https://revistas.unlp.edu.ar/revagro>

Recibido: 10/03/2019

Aceptado: 24/06/2019

Disponible on line: 01/07/2020

ISSN 0041-8676 - ISSN (on line) 1669-9513, Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales, UNLP, Argentina



## INTRODUCCION

Algunas especies del género *Lotus* constituyen un componente relevante en pastizales con restricciones ambientales de varios países de Sudamérica (Escaray et al., 2012). *Lotus tenuis* Waldst et Kit (ex *Lotus glaber* Mill) es una leguminosa forrajera perenne de importancia económica naturalizada en los pastizales de la Pampa Deprimida (provincia de Buenos Aires, Argentina) (Vignolio & Fernández, 2011). Su importancia en la mejora de estos pastizales (principal recurso forrajero para el ganado de cría de la región) se relaciona con su alto valor nutritivo (Mc Graw et al., 1989; Cauhépé, 2004), con la capacidad de fijar N atmosférico por vía simbiótica (Quinos et al., 1998) y, fundamentalmente, con la habilidad de crecer en suelos con baja fertilidad y con problemas de anegamiento y/o elevado contenido de sales (Miñón & Colabelli, 1993; Vignolio & Fernández, 2006).

El pastizal de la Pampa Deprimida presenta una notable heterogeneidad topográfica y geomorfológica que ha determinado variaciones en el régimen de anegamiento y en las propiedades de los suelos (Batista et al., 2005; Burkart et al., 2005). La amplia distribución de una especie en un ambiente heterogéneo puede deberse a una alta plasticidad fenotípica o a una elevada variación genética entre sus individuos (Williams et al., 1995). En este sentido, estudios realizados sobre el comportamiento de la germinación y emergencia en *L. tenuis* en condiciones de baja temperatura (Entio & Mujica, 2009) y en un amplio rango de concentraciones salinas (Mujica & Rumi, 1999) indicaron la existencia de variabilidad inter e intrapoblacional, respectivamente. Además, en un estudio efectuado en genotipos de *L. tenuis* seleccionados *in situ* en un bajo salino de la Pampa Deprimida se informó variabilidad para caracteres asociados al vigor de plántula (Ixtaina & Mujica, 2004).

Una de las estrategias reproductivas que presentan las poblaciones vegetales es su capacidad para sobrevivir ante factores adversos en el estado de semillas ya que éstas tienen mayor tolerancia que las plantas a condiciones ambientales desfavorables (Baskin & Baskin, 2014). En un estudio sobre la variación estacional del banco de semillas de especies herbáceas en diferentes ambientes, Thompson & Grime (1979) concluyeron que la mayor fuerza evolutiva que determina la naturaleza del banco de semillas es la ventaja selectiva derivada de mecanismos de dormición de semillas y germinación que permiten a las plántulas evadir los efectos potencialmente dominantes de las plantas establecidas.

La dormición es una característica innata de las semillas que puede definirse como la imposibilidad de una semilla viable intacta de completar su germinación en condiciones favorables (Bewley, 1997; Finch-Savage & Leubner-Metzger, 2006). El tipo de dormición puede influir, tanto a nivel de población como de especies, en procesos tales como colonización, adaptación, especiación y extinción (Willis et al., 2014). De acuerdo a Nikolaeva (1977) existen dos tipos de dormición: endógena y exógena según sean las características del embrión o de las cubiertas seminales las causas que impiden la germinación, respectivamente.

En muchas especies los tejidos que rodean al embrión pueden actuar como barreras de permeabilidad que impiden la absorción de agua o el intercambio gaseoso, como barreras mecánicas que impiden la expansión del embrión o como fuente de inhibidores de la germinación (Adkins et al., 2002). El impedimento de la absorción de agua es un mecanismo de dormición común encontrado en semillas de muchas leguminosas forrajeras (Mujica & Rumi, 1991; 1994; Fresnillo et al., 1994; Renzi et al., 2011).

Las semillas de *L. tenuis* son impermeables al agua por las características de sus tegumentos (Miñón et al., 1990; Mujica & Rumi, 1993). La escarificación mecánica es uno de los métodos que permite superar la dormición debida a cubiertas duras y es el más usado en semillas forrajeras de estación cálida (Adkins et al., 2002). Según Fresnillo et al. (1994), la necesidad de escarificación de las semillas de algunas especies para promover su germinación constituye una estrategia adaptativa que les permite sobrevivir en condiciones ambientales desfavorables mientras que el proceso de escarificación no se complete.

Existen antecedentes que indican que la conservación de semillas de *L. tenuis* por períodos prolongados a bajas temperaturas (5–7 °C) produce la reversión de la dormición y que este factor constituye el determinante natural del ablandamiento de los tegumentos impermeables de la especie (Mujica & Rumi, 1991; 1993). Además, Mujica & Rumi (1993) informaron que las semillas escarificadas de *L. tenuis* almacenadas a 5-7 °C conservan su viabilidad por un período de 6 años.

La hipótesis de este trabajo considera que existen diferencias en la respuesta de la germinación de semillas a los factores tratamiento pregerminativo y tiempo de almacenamiento entre genotipos de *L. tenuis* y que existe una asociación positiva entre la cubierta dura y el comportamiento germinativo a largo plazo. El objetivo fue evaluar el efecto de la escarificación mecánica en dos momentos luego de la cosecha en la respuesta germinativa de semillas de 23 genotipos de *L. tenuis* almacenadas en condiciones de laboratorio (T°C 20±5) sin escarificar y el rol de las cubiertas duras sobre dicha respuesta a largo plazo.

## METODOLOGIA

Se evaluó el comportamiento germinativo de semillas de 23 genotipos de *L. tenuis* seleccionados de poblaciones naturales de pastizales de la Pampa Deprimida en el marco de un Programa de Mejoramiento Genético de la Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales - Universidad Nacional de La Plata. Para tal fin se tomaron simientes de los 23 genotipos de una parcela de policruza de 132,25 m<sup>2</sup> con diseño de cuadrado latino (132,25 m<sup>2</sup> x 4 plantas / m<sup>2</sup>= 529 plantas) sembrada en marzo de 1992 en la Estación Experimental Gorina, La Plata, Buenos Aires, Argentina (34°54'29''S; 58°02'25''O). En enero de 1993 se efectuó la recolección manual de las semillas de los 23 genotipos. Las semillas de cada genotipo se almacenaron por separado en sobres de papel madera a temperatura de ambiente de laboratorio (T°C 20±5) hasta la realización de las pruebas de germinación.

Con estas semillas se realizó un ensayo de germinación con un diseño completo al azar (DCA), con arreglo factorial. Los factores fueron genotipos con 23 niveles (1-23), tratamiento pregerminativo con dos niveles (E: escarificado mecánico; NE: ausencia de escarificado) y tiempo de almacenamiento con dos niveles [t1: 0,25 años (03/1993); t2: 22,5 años (06/2015)] dando un total de 92 tratamientos con cuatro repeticiones cada uno. La unidad experimental fue una caja de Petri con 50 semillas. Debido a que la dureza de la semilla se puede romper escarificándolas con papel de lija (Vignolio et al., 2010), para lograr la condición E las semillas se colocaron sobre la parte abrasiva de una lija fina (n° 180) y se las frotó con una lija de menor graduación ejerciendo una presión suave por un tiempo aproximado de 10 a 15 segundos.

La siembra se hizo de forma manual colocando 50 semillas dentro de cada caja de Petri sobre papel de filtro humedecido para su germinación; el nivel de hidratación se mantuvo constante según requerimientos. Las cajas se colocaron dentro de una cámara incubadora a una temperatura de  $20 \pm 1$  °C en oscuridad. Se registró, cada 24 h, el número de semillas germinadas (visualización de la radícula  $\geq 2$  mm de longitud) y, al finalizar el ensayo, el número de semillas duras (se consideró semillas duras aquellas que visualmente se percibían como no embebidas). La finalización del ensayo se determinó luego de 4 días consecutivos sin registro de nueva germinación (día 8 para t1 y día 11 para t2). Se calculó el porcentaje de germinación acumulada (Gac%) y el porcentaje de semillas duras (Sd%). A su vez, para t2, en el tratamiento E, se calculó el índice de velocidad germinativa (IVG) que expresa la rapidez con que la semilla germina como índice de su vitalidad. Para el cálculo se empleó la ecuación (1) propuesta por Maguire (1962):

$$IVG = \sum_{i=1}^n \frac{G_i}{t_i} \quad (1)$$

donde "t<sub>i</sub>" es el número de días transcurridos desde el inicio del ensayo hasta el momento del recuento iésimo y "G<sub>i</sub>" es el número de simientes germinadas en el recuento iésimo.

Al analizar las variables relevadas en el ensayo se encontró que no cumplían con los supuestos de normalidad y homocedasticidad necesarios para realizar un ANOVA. Se intentó corregir las variables mediante transformaciones pero no se cumplieron los supuestos, principalmente, por la naturaleza porcentual de las variables. Por esta razón se realizó un ANOVA no paramétrico (Kruskal-Wallis) con una posterior comparación de medianas.

Para t2 se analizaron las correlaciones (coeficiente de correlación de Pearson) entre Sd% y la Gac% e IVG y las regresiones simples de Sd% del tratamiento NE sobre el Gac% y sobre IVG del tratamiento E. Los análisis estadísticos se realizaron utilizando el Programa InfoStat versión 2015 (Di Rienzo et al., 2015).

## RESULTADOS

Los resultados mostraron que la interacción triple (Tratamiento pregerminativo - Tiempo de

almacenamiento - Genotipo) resultó significativa para las dos variables estudiadas [germinación acumulada: H= 348,39;  $p < 0,0001$  y semilla dura: H= 335,87;  $p < 0,0001$ ].

Para la variable germinación acumulada la comparación de medianas mostró los siguientes agrupamientos: los valores más altos (Grupo 1) y medios altos (Grupo 2) correspondieron al tratamiento escarificado a los 0,25 y 22,5 años de almacenamiento, respectivamente; los valores más bajos (Grupo 4) y medios bajos (Grupo 3) correspondieron al tratamiento no escarificado a los 22,5 y 0,25 años de almacenamiento, respectivamente (Figura 1). El efecto del factor genotipo sólo resultó significativo para el tratamiento escarificado a los 22,5 años de almacenamiento (Figura 1).

Para la variable semilla dura la comparación de medianas mostró los siguientes agrupamientos: los valores más altos (Grupo 1) y medios (Grupo 2) correspondieron al tratamiento no escarificado a los 0,25 años y a los 22,5 años de almacenamiento, respectivamente; los valores más bajos (Grupo 3) al tratamiento escarificado independientemente del tiempo de almacenamiento. El efecto del factor genotipo solo resultó significativo para el tratamiento no escarificado a los 22,5 años de almacenamiento (Figura 2).

La correlación entre la semilla dura y la germinación acumulada e índice de velocidad germinativa fue significativa ( $p \leq 0,01$ ) y positiva (Tabla 1).

Las regresiones simples de la semilla dura sobre la germinación acumulada y sobre el índice de velocidad germinativa resultaron significativas ( $p \leq 0,01$ ) (Figuras 3 a, b).

## DISCUSION

Las semillas de *L. tenuis*, por las características de sus tegumentos, son impermeables al agua y es frecuente encontrar un elevado porcentaje ( $> 90\%$ ) de semillas que no germinan inmediatamente debido a la dureza de su cubierta (Miñón et al., 1990; Mujica & Rumi, 1991; 1993). En el presente trabajo se obtuvieron valores iniciales promedio de semilla dura de 93,2%. Este valor es esperable debido a que la cosecha manual de las semillas no daña la cubierta dura (Mujica & Rumi, 1991; 1993). Por su parte, Zimmermann et al. (2003) y Boschi et al. (2016) en lotes comerciales de semillas de leguminosas forrajeras informaron valores iniciales promedio de semilla dura de entre 6 y 24% según la especie. Esta diferencia podría atribuirse parcialmente a la cosecha mecánica dado que ésta produce un efecto abrasivo sobre la cubierta dura similar a la escarificación física.

En este trabajo se observaron diferencias en el comportamiento germinativo entre semillas escarificadas y no escarificadas de los genotipos estudiados. La escarificación tuvo un efecto positivo sobre la germinación acumulada en ambos periodos de almacenamiento. Este resultado coincide con lo informado por Fresnillo et al. (1994) para *Medicago mínima*, cuya germinación registró un aumento del 64% como consecuencia de la escarificación leve con lija.

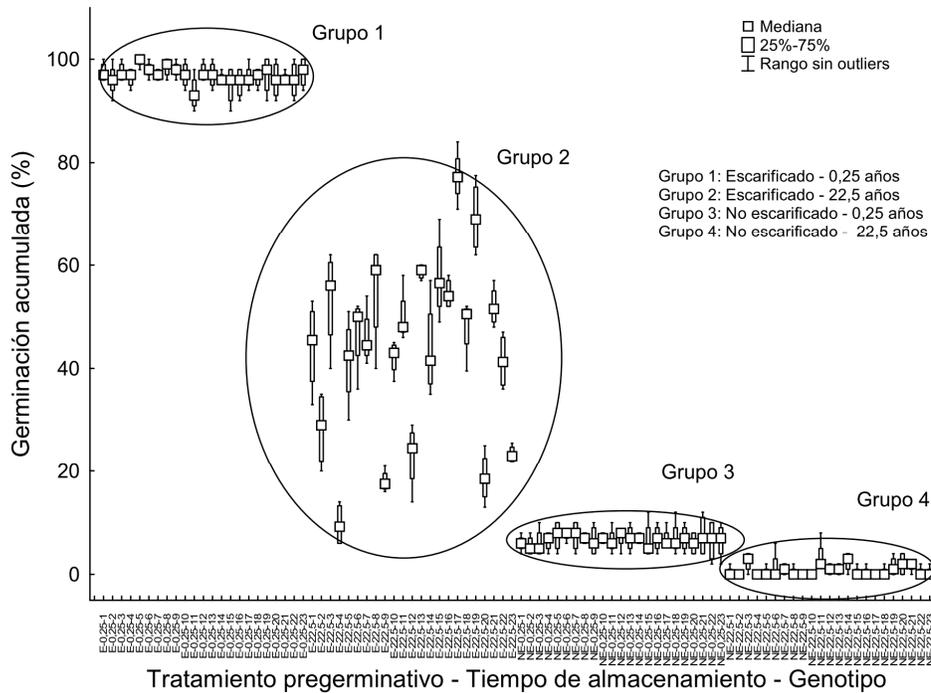


Figura 1. Germinación acumulada (%) de semillas de 23 genotipos de *L. tenuis* (1-23), almacenadas en condiciones de laboratorio ( $T^{\circ}C\ 20\pm 5$ ) sin escarificar, en dos momentos después de la cosecha (0,25 y 22,5 años) expuestas a dos tratamientos pregerminativos (E: escarificado; NE: no escarificado). Grupos diferentes indican diferencias significativas ( $p\leq 0,01$ ). Dentro del Grupo 2 existen diferencias significativas ( $p\leq 0,01$ ) entre genotipos. Prueba de Kruskal-Wallis.

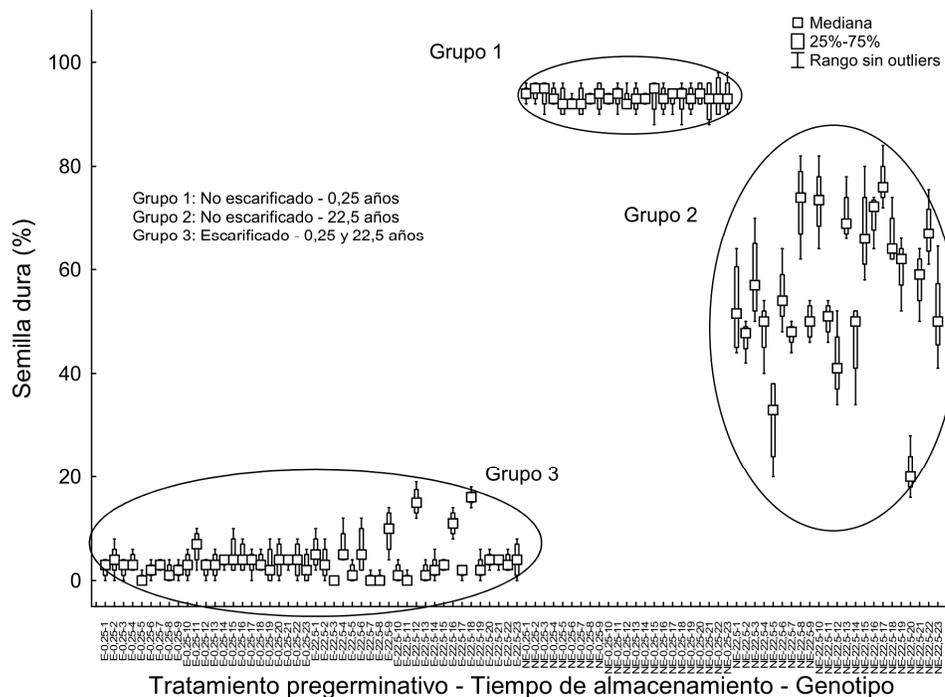


Figura 2. Porcentaje de semilla dura en muestras de semillas de 23 genotipos de *L. tenuis* (1-23), almacenadas en condiciones de laboratorio ( $T^{\circ}C\ 20\pm 5$ ) sin escarificar, en dos momentos después de la cosecha (0,25 y 22,5 años) expuestas a dos tratamientos pregerminativos (E: escarificado; NE: no escarificado). Grupos diferentes indican diferencias significativas ( $p\leq 0,01$ ). Dentro del Grupo 2 existen diferencias significativas ( $p\leq 0,01$ ) entre genotipos. Prueba de Kruskal-Wallis.

Tabla 1. Correlaciones entre el porcentaje de semilla dura (Sd%) y el porcentaje de germinación acumulada (Gac%) e índice de velocidad germinativa (IVG) en semillas de 23 genotipos de *Lotus tenuis* almacenadas sin escarificar durante 22,5 años (n=23). Coeficiente de correlación de Pearson. Referencias: \*\*: p ≤ 0,01.

	Gac%	IVG
Sd%	0,5768**	0,5651**

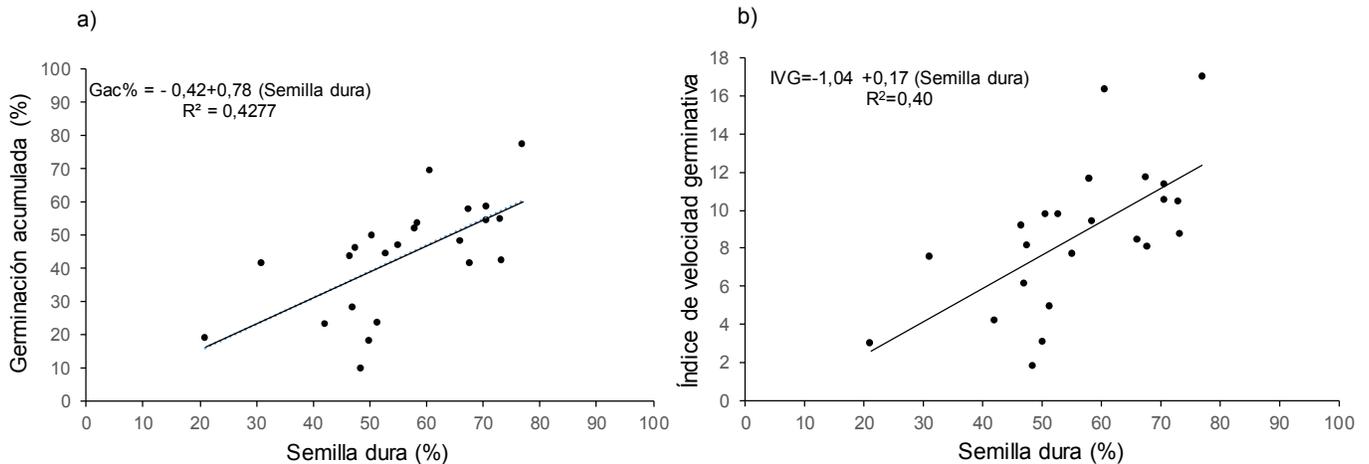


Figura 3. Relación entre el porcentaje de semilla dura y caracteres vinculados al comportamiento germinativo (n=23): a) germinación acumulada (%); b) índice de velocidad germinativa.

Para la germinación acumulada, en el tratamiento escarificado, a los 22,5 años de almacenamiento, se observaron diferencias entre los genotipos. Esto coincide con otros estudios que informaron diferencias en el comportamiento germinativo de semillas escarificadas de *L. tenuis* tanto entre genotipos (Mujica & Rumi, 1999) como entre poblaciones (Entio & Mujica, 2009). Se observó, además, que todos los genotipos presentaron mayor porcentaje de semillas duras en el tratamiento no escarificado en comparación con el escarificado. Esto es esperable debido a que con la cosecha manual las cubiertas duras de las semillas se mantienen intactas.

En muchas leguminosas forrajeras es frecuente encontrar que las cubiertas duras constituyen un mecanismo de dormición al impedir la absorción de agua. Existen estudios que indican que las condiciones y el período de almacenamiento afectan la impermeabilidad de los tegumentos (Búrbano, 1990; Mujica & Rumi, 1991; 1993). Específicamente para *L. tenuis*, el almacenamiento de semillas a bajas temperaturas (5 - 7°C) por períodos prolongados produce la reversión de la impermeabilidad (Mujica & Rumi, 1991; 1993). En el presente trabajo, luego de 22,5 años de almacenamiento en condiciones de ambiente de laboratorio (T°C 20±5), el porcentaje promedio de semilla dura disminuyó un 32,3%. Además se observó que dicha disminución fue variable entre los genotipos. Por su parte, Zimmermann et al. (2003) informaron, para cuatro especies leguminosas forrajeras, una disminución promedio del 5% en el porcentaje de semilla dura en similares condiciones de

almacenamiento, aunque considerando un período de 3 a 4,5 años.

Las semillas escarificadas de *L. tenuis* almacenadas a bajas temperaturas (5 - 7°C) conservan su capacidad germinativa por un período de 6 años (Mujica & Rumi, 1991). En el presente trabajo se observó que semillas almacenadas en condiciones de ambiente de laboratorio sin escarificar, luego de 22,5 años presentaron una germinación acumulada promedio de 43%. En este sentido, Zimmermann et al. (2003) informaron para semillas de especies leguminosas forrajeras, almacenadas en condiciones similares y por un período de 3 a 4,5 años, un poder germinativo promedio de 37%. Esta diferencia se atribuiría a que en este último estudio las semillas provenían de lotes comerciales cosechados de manera mecánica.

La correlación entre la semilla dura y la germinación acumulada e índice de velocidad germinativa mostró valores significativos y altos (Tabla 1). Los análisis de regresión simple entre dichos parámetros mostraron que la semilla dura explicó un 42,7% de la variabilidad de la germinación acumulada y un 40,8% del vigor germinativo. Esto indica que luego de 22,5 años los genotipos que conservaron altos porcentajes de semilla dura tuvieron un mejor comportamiento germinativo y que dicho comportamiento se debió significativamente a la presencia de tegumentos impermeables. Este resultado coincide con una investigación realizada por Búrbano (1990) en varias especies leguminosas forrajeras tropicales, donde informó que la disminución en el porcentaje de germinación de las semillas fue al menos 4 veces menor en las especies que conservaron

mayores porcentajes de semillas duras que en aquellas en las que las cubiertas de sus semillas se ablandaron más tempranamente.

Este estudio demostró que la escarificación mecánica (tanto en el corto como en el largo plazo) y el tiempo de almacenamiento afectan de manera positiva y negativa, respectivamente, al comportamiento germinativo de los genotipos estudiados y que el ablandamiento de la cubierta dura es variable entre los genotipos. Además, evidenció que dicha cubierta se vincula con la conservación de la capacidad germinativa en el largo plazo.

#### Agradecimientos

El presente trabajo fue financiado por el Programa de Incentivos para Docentes-Investigadores de la Secretaría de Políticas Universitarias (Ministerio de Educación, Cultura, Ciencia y Tecnología). Proyecto A295: "Investigación aplicada al mejoramiento genético de forrajeras para mejorar la productividad sustentable en pastizales de ambientes marginales"; Universidad Nacional de La Plata (2016-2019). Director (2016-2017): Ing. Agr. María de la Merced Mujica; Director (2017-2019): Ing. Agr. Rodolfo Bezus.

Agradecemos a la Dra. Ixtaina por la lectura crítica del manuscrito y a los Ing. Agr. Bolaños y Oyhamburu por los aportes realizados.

#### BIBLIOGRAFIA

**Adkins, S.W., S.M. Bellairs & D.S. Loch.** 2002. Seed dormancy mechanisms in warm season grass species. *Euphytica* 126: 13-20.

**Baskin, C.C. & J.M. Baskin.** 2014. Germination Ecology of Seeds in the Persistent Seed Bank. En: *Seeds Ecology, Biogeography, and Evolution of Dormancy and Germination*. Academic Press, San Diego, USA. pp. 187-276.

**Batista, W.B., M.A. Taboada, R.S. Lavado, S.B. Perelman & R.J.C. León.** 2005. Asociación entre comunidades vegetales y suelos en el pastizal de la Pampa Deprimida. En: *La heterogeneidad de la vegetación de los agroecosistemas. Un homenaje a Rolando J.C. León*. Oesterheld, M., M. Aguiar, C. Ghersa & J. Paruelo (comps). Editorial Facultad Agronomía. Universidad de Buenos Aires. Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Buenos Aires, Argentina. pp. 113-129.

**Bewley, J.D.** 1997. Seed Germination and Dormancy. *The Plant Cell* 9: 1055-1066.

**Boschi, F., P. Latorre, S. Saldanha, J. Machado, O. Betancur & S. Moure.** 2016. Importancia de las semillas duras en leguminosa forrajeras producidas en Uruguay. *Agrociencia Uruguay* 20 (2): 43-50.

**Búrbano, E.A.** 1990. Efecto de la escarificación química en la calidad de semillas de *Centrosema* spp. durante el almacenamiento. *Agronomía Mesoamericana* 1: 63-67.

**Burkart, S.E., M.F. Garbulsky, C.M. Ghersa, J.P. Guerschman, R.J.C. León, M. Oesterheld, J.M. Paruelo & S. Perelman.** 2005. Las comunidades potenciales del pastizal pampeano bonaerense. En: *La heterogeneidad de la vegetación de los*

agroecosistemas. Un homenaje a Rolando J.C. León. Oesterheld, M., M. Aguiar, C. Ghersa & J. Paruelo (comps). Editorial Facultad Agronomía. Universidad de Buenos Aires. Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Buenos Aires, Argentina. pp. 379-399.

**Cauhépé, M.A.** 2004. Does *Lotus glaber* improve beef production at the Flooding Pampas? *Lotus Newsletter* 34: 30-35.

**Di Rienzo J.A., F. Casanoves, M.G. Balzarini, L. Gonzalez, M. Tablada & C.W. Robledo.** InfoStat versión 2015. Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina. Disponible en: <http://www.infostat.com.ar>. Último acceso: octubre de 2016.

**Entio, L.J. & M.M. Mujica.** 2009. Comportamiento de la germinación y emergencia de *Lotus tenuis* en condiciones de baja temperatura. *Revista Argentina de Producción Animal* 29 (Sup. I): 424-425.

**Escaray, F.J., A.B. Menendez, A. Gárriz, F.L. Pieckenstain, M.J. Estrella, L.N. Castagno, P. Carrasco, J. Sanjuan & O.A. Ruiz.** 2012. Ecological and Agronomic importance of the plant genus *Lotus*. Its application in grassland sustainability and the amelioration of constrained and contaminated soils. *Plant Science* 182: 121-133.

**Finch-Savage, W.E. & G. Leubner-Metzger.** 2006. Seed dormancy and the control of germination. *New Phytologist* 171: 501-523.

**Fresnillo F., O.A. Fernández & C.A. Busso.** 1994. Factores en la germinación de dos especies anuales forrajeras de la Región Semiárida Argentina. *Turrialba* 44(2): 95-99.

**Ixtaina, V.Y. & M.M. Mujica.** 2004. Variabilidad en la tolerancia a la salinidad en genotipos de *Lotus glaber* Mill. seleccionados en una depresión salina de la Pampa Deprimida Bonaerense (Argentina). *Pastos* 34(1): 79-91.

**Maguire, J.D.** 1962. Speed of germination aid in selection and evaluation for seedling emergence and vigour. *Crop Science* 2: 176-177.

**Mc Graw, R.L., P.R. Beuselinck & G.C. Marten.** 1989. Agronomic and forage quality attributes of diverse entries of birdsfoot trefoil. *Crop Science* 29: 1160-1164.

**Miñón, D.P., G.H. Sevilla, L. Montes & O. Fernández.** 1990. *Lotus tenuis*: leguminosa forrajera para la Pampa Deprimida. Boletín Técnico N° 98. Subsecretaría de Agricultura, Ganadería y Pesca, INTA, Centro Regional Buenos Aires Sur, EEA Balcarce, Buenos Aires, Argentina. 16 pp.

**Miñón, D.P. & M.R. Colabelli.** 1993. Intersiembrado de *Lotus tenuis* en tres comunidades nativas de la Pampa Deprimida. *Revista Argentina de Producción Animal* 13: 133-140.

**Mujica, M.M. & C.P. Rumi.** 1991. Estado de dureza de las semillas de *Lotus tenuis*: efecto de las condiciones de conservación. *Revista de la Facultad de Agronomía (La Plata)* 66/67: 63-66.

**Mujica, M.M. & C.P. Rumi.** 1993. Dinámica del estado de dureza de semillas de *Lotus tenuis* (Waldst et Kit) obtenidas del suelo en respuesta a un régimen de baja temperatura. *Revista de la Facultad de Agronomía (La Plata)* 69(1): 69-75.

**Mujica, M.M. & C.P. Rumi.** 1994. Presencia de dos tipos de dormición en las semillas de *Lotus tenuis*

(Waldst et kit). Revista de la Facultad de Agronomía (La Plata) 70: 5-12.

**Mujica, M.M. & C.P. Rumi.** 1999. Effects of salinity on the germination of *Lotus glaber* Mill (= *Lotus tenuis* Waldst et Kit, ex Wild). Lotus Newsletter. Disponible en: <http://www.psu.missouri.edu/lnl/v30/Mujica2.htm>. Ultimo acceso: octubre de 2017.

**Nikolaeva, M.G.** 1977. Factors controlling the seed dormancy pattern. En: The physiology and biochemistry of seed dormancy and germination. Kahn, A.A. (Ed.), North-Holland Publishing Company, Amsterdam. pp. 51-74.

**Quinos, P., P. Insausti & A. Soriano.** 1998. Facilitative effect of *Lotus tenuis* on *Paspalum dilatatum* in lowland grassland of Argentina. Oecología 114: 427-431.

**Renzi, J.P., J.C. Lasa & M.A. Cantamutto.** 2011. Influencia del estado de madurez a cosecha sobre la calidad de semillas de alfalfa (*Medicago sativa*). Revista de Investigaciones Agropecuarias 37(3): 261-267

**Thompson, K. & J.P. Grime.** 1979. Seasonal variation in the seed banks of herbaceous species in ten contrasting habitats. Journal of Ecology 67: 893-921.

**Vignolio, O.R. & O.N. Fernández.** 2006. Bioecología de *Lotus glaber* Mill. (Fabaceae) en la Pampa

Deprimida (provincia de Buenos Aires, Argentina). Revista Argentina de Producción Animal 26: 113-130.

**Vignolio, O.R. & O.N. Fernández.** 2011. *Lotus tenuis* seedling establishment and biomass production in Flooding Pampa grasslands (Buenos Aires, Argentina). Chilean Journal of Agricultural Research 71(1): 96-103.

**Vignolio, O.R., G.S. Cambareri & N.O. Maceira.** 2010. *Lotus tenuis* (Fabaceae). Productividad y manejo agronómico. Revista Argentina de Producción Animal 30 (1): 97-116.

**Williams, D.G., R.N. Mack & R.A. Black.** 1995. Ecophysiology of introduced *Pennisetum setaceum* on Hawaii: The role of phenotypic plasticity. Ecology 76(5): 1569-1580.

**Willis, C.G., C.C. Baskin, J.M. Baskin, J.R. Auld, D.L. Venable, J. Cavender-Bares, K. Donohue, R. Rubio de Casas & the NESCent Germination Working Group.** 2014. The evolution of seed dormancy: environmental cues, evolutionary hubs, and diversification of the seed plants. New Phytologist 20: 300-309.

**Zimmermann, L.R., A.A. Galussi, A.H.M. Martinelli & A.P. Fernández.** 2003. Viabilidad y longevidad de las semillas duras de leguminosas forrajeras. Ciencia, Docencia y Tecnología 26: 231-257.