

305

Revista de la Facultad de Agronomía, La Plata. Tomo 70, Año 1994: 5-12

Presencia de dos tipos de dormición en las semillas de *Lotus tenuis* (Waldst et Kit)

María M Mujica¹ y Clara P Rumf²

1 Área de Genética y Mejoramiento Animal y Vegetal, 2 Instituto de Fisiología Vegetal, Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales, UNLP, CC 31, 1900 La Plata, Argentina

Recibido: 23 de Febrero de 1993. Aceptado: 15 de Abril de 1994

RESUMEN

Se investigó en semillas de *L. tenuis* (Waldst et Kit) la presencia de un mecanismo de dormición endógena, que complementaría al de la impermeabilidad de los tegumentos en la función de diferir la germinación en condiciones naturales.

Se evaluó la dinámica pos-cosecha del estado de dureza y de la germinación de las semillas, en relación a distintos grados de madurez de los frutos de una población mejorada, y de los frutos maduros cosechados de tres clones en un lote de policruza al azar.

En la evaluación inmediata a la cosecha se determinó la presencia de semillas duras sólo en el grado más avanzado de madurez de los frutos (16,6% de las semillas con capacidad de imbibición). La ausencia de germinación en todos los grados de madurez, aun en el más avanzado que fue escarificado, indicó la presencia de una dormición diferente y de manifestación previa a la causada por la impermeabilidad de los tegumentos. Se determinó que después de la cosecha estos mecanismos de dormición evolucionaron en sentido inverso. Las sucesivas evaluaciones mostraron un aumento progresivo del porcentaje de semillas duras y la pérdida gradual de la dormición endógena en todos los grados de madurez evaluados. A los 48 días a partir de la cosecha la germinación de las semillas sometidas a escarificación presentó el valor máximo (94%), indicando la pérdida completa del estado de dormición endógena. El comportamiento de las semillas cosechadas de los clones, confirmó la presencia de los dos estados de dormición y su patrón de co-evolución después de la cosecha. Entre los materiales evaluados se observó alguna diferencia en la dinámica de ambos procesos. La dormición endógena desapareció cerca de los 36 días después de la cosecha, en las condiciones del laboratorio.

Palabras claves: *Lotus tenuis*, germinación, dormición, semillas duras, banco de semillas

Two dormancy types in *Lotus tenuis* (Waldst et Kit) seeds

Summary

Lotus tenuis (Waldst et Kit) seeds were investigated in order to determine the presence of another dormancy mechanism complementing the one of tegument impermeability and responsible for differing germination under natural conditions.

Post-harvest dynamics of hardness and germination of seeds was studied in relation to different maturity fruit stages of a improved population and mature fruits harvested from three clones of a random polycross lot.

Evaluation immediately after harvest resulted in the presence of hard seeds only when fruits were in their most advanced maturity stage (16.6% of seeds capable of imbibition).

Absence of germination at every maturity stage, even the most advanced one which was scarified (92.6% imbibition), indicated the presence of a different type of dormancy, prior to the one caused by tegument impermeability. In successive evaluations, a progressive increase in the percentage of hard seeds and in the germination capacity at every maturity stage was noted. The dynamics of these dormancy mechanisms evolved inversely. Scarified seeds presented its highest value of germination (94%) 18 days after harvest, which indicated that dormancy detected previously had been lost. Behaviour of seeds harvested from the clones confirmed the presence of two different dormancy states with their co-evolution post-harvest pattern. Materials were somewhat different in the dynamics of both processes. Endogenous dormancy disappeared near 36 days after harvest under laboratory conditions.

Key words: *Lotus tenuis*, germination, dormancy, seed bank, hard seeds

INTRODUCCION

La impermeabilidad o "dureza" de los tegumentos es una característica frecuente en las semillas de leguminosas. En muchas de las especies de esta familia su manifestación ha sido asociada con la deshidratación de las semillas durante la maduración (Raleigh, 1930; Helgeson, 1932; Hutton y Porter, 1937; Aitken, 1939; Quinlivan, 1968).

En *Lotus corniculatus* (L) se ha determinado un porcentaje variable de semillas impermeables (McDonald 1946, Brown 1955). La impermeabilidad al agua comienza a manifestarse alrededor de los treinta días a partir de la floración (Li y Hill 1989). Los mismos autores han determinado que las semillas recién cosechadas presentan, además, otro estado de dormición previo a la impermeabilización

de los tegumentos, que desaparece durante su desecamiento luego de 40 días de conservación en condiciones de laboratorio.

Lotus tenuis se ha naturalizado recientemente en la Pampa Deprimida. El éxito de la especie para difundirse en la región despertó interés para investigar las posibles estrategias involucradas. En *Lt* también es conocida la presencia de semillas duras, más del 90% en muestras exentas del proceso abrasivo de la trilla mecánica (Sevilla, 1989; Mujica y Rumi, 1991). La floración de *Lt* es indeterminada, extendiéndose desde noviembre a marzo y el período desde la fecundación hasta la madurez de los frutos es de 25 a 30 días (Miñón *et al* 1990). Estos son dehiscentes apenas alcanzan la madurez y al abrirse esparcen las semillas. Como consecuencia el esparcimen-

to de las mismas ocurre durante todo el verano y parte del otoño. Su propagación bajo condiciones de pastoreo es favorecida por los vacunos a través de sus deyecciones (Miñón *et al.*, 1990). Se ha determinado en una pastura que la aparición de plántulas de *Lt* a partir del banco de semillas existente en el suelo ocurre en forma escalonada. Presenta un pequeño flujo de frecuencia durante el verano y uno máximo al finalizar el invierno (Sevilla, 1989). Las semillas duras de *Lt* se vuelven permeables durante su almacenamiento en condiciones de baja temperatura (Mujica y Rumi, 1991, 1992). Esta dormición de tipo físico y la modalidad de su desaparición bajo las condiciones naturales tiene consecuencias importantes en la dinámica del banco de semillas del suelo. La evolución del estado de dureza de los tegumentos de las semillas durante el proceso de maduración no ha sido estudiado en esta especie. La magnitud del coeficiente de asociación entre *Lt* y *Lc*, determinado por Grant y Zandstra (1968), sugiere que se podría esperar similitud en un número considerable de caracteres.

En forma similar a lo que ocurre en *Lc*, las semillas de *Lt* podrían presentar, además de los tegumentos impermeables, otra dormición, de tipo endógeno. Esta impediría la germinación inmediata de las semillas que han alcanzado el estado de viabilidad, mientras continúan retenidas en la planta y también cuando caen al suelo.

El objetivo de este trabajo fue poner a prueba las dos hipótesis siguientes: 1). La impermeabilización de los tegumentos de las semillas de *Lt* se desarrolla gradualmente durante el proceso natural de maduración y desecación en la planta y aún en el período de pos-cosecha. 2). En forma similar a *Lc* las semillas de *Lt* poseen, además, otro mecanismo de dormición previo al estado de dureza. Ambos mecanismos contribuirían a regular la

germinación en el banco de semillas del suelo. Se investigó la manifestación y evolución, después de la cosecha, del estado de dureza de los tegumentos y de la germinación de las semillas escarificadas de *Lt* en relación a: I) distinto grado de madurez de los frutos cosechados en una población. II) frutos maduros, cosechados en distintos clones en policruza.

MATERIALES Y METODOS

Experiencia I) Evolución del estado de dureza y germinación potencial en relación al grado de madurez de los frutos

En diciembre de 1990 se cosecharon frutos en distintos estados de madurez en un lote de multiplicación de una población mejorada de *Lt*, establecido en la Est Exp de Gorina (Prov de Buenos Aires), Argentina. Las semillas se recolectaron en forma manual y se agruparon en clases de acuerdo a la madurez de los frutos: (A) secos; (B) pardos, pero no totalmente secos; (C) blanquecinos, con semillas de color verde amarillento; y (D) de color verde visiblemente más claros que las nervaduras, con semillas de color verde.

En una muestra de cada clase de semillas se evaluó, desde el día siguiente a la cosecha, el porcentaje de semillas embebidas y germinadas. El resto se mantuvo en condiciones de laboratorio (la temperatura varió entre 22 y 30 °C), hasta que se realizaron las mismas determinaciones a los 5 y 48 días de la cosecha. Las evaluaciones se realizaron en cajas de Petri sobre papel de filtro húmedo, con 50 semillas por caja, en un diseño totalmente aleatorizado, con 3 repeticiones. En la clase A, se determinó la germinación potencial. Esta es considerada aquí como la capacidad germinativa de las semillas que han sido liberadas de la impermeabilización de sus tegumentos, mediante una escarificación.

La temperatura de germinación fue $21^{\circ}\text{C}\pm 1$. Diariamente, durante 7 días, se registró la imbibición y germinación. Luego se determinaron los respectivos porcentajes acumulados. Las semillas embebidas fueron reconocidas por su mayor volumen, tegumentos brillantes y coloración más pálida. Se consideraron germinadas aquellas cuya radícula presentaba una longitud mínima de 2 mm.

Para realizar el análisis de la varianza los datos fueron transformados en arcsen.

Experiencia II) Evolución del estado de dureza y de la germinación potencial en relación a frutos maduros cosechados en distintos clones en policruza.

Se utilizaron semillas cosechadas de 3 clones de una colección de 32 genotipos, clonados en 20 repeticiones y expuestos a policruza al azar, implantada en la Est Exp de Gorina (Prov de Buenos Aires), Argentina. La cosecha se realizó en forma manual en el mes de enero. Muestras de semilla de los tres clones (25, 26 y 2) se mantuvieron en las

condiciones del laboratorio durante las 5 semanas subsiguientes a la cosecha. En este período se realizaron 4 ensayos, a los 4, 13, 22 y 36 días. Se determinó el porcentaje de semillas duras y la germinación potencial en muestras sin escarificar y escarificadas, respectivamente. La escarificación se realizó el día que se inició cada ensayo. Estos se efectuaron bajo las mismas condiciones de la experiencia I.

RESULTADOS

Experiencia I)

La evaluación realizada inmediatamente después de la cosecha permitió determinar la presencia de semillas duras (no embebidas) sólo en la clase A, que corresponde al estado más avanzado de madurez, presentando sólo un 16,6% de semillas embebidas (no duras) (Tabla 1). No se registró germinación en ninguna de las clases, ni aún en el caso de las semillas escarificadas de la clase A, que pre-

Tabla 1 Evolución pos-cosecha de la capacidad de imbibición y germinación de semillas de *L. tenuis* según distintos estados de madurez de las mismas. Los valores son promedios \pm ES.(e) significa semilla escarificada

Post-harvest evolution of *L. tenuis* seeds imbibition and germination capacity according to their different maturity stages. Values are average \pm SE. (e) stands for scarified seed.

Estados de madurez	Días transcurridos a partir de la cosecha					
	1		5		48	
	Imbibición (%)	Germinación (%)	Imbibición (%)	Germinación (%)	Imbibición (%)	Germinación (%)
A(e)	92,6 \pm 0,96	0,00	92,0 \pm 3,13	12,6 \pm 0,56	96,0 \pm 1,40	94,0 \pm 1,41
A	16,6 \pm 1,90	0,00	7,3 \pm 6,85	0,0	6,6 \pm 1,03	1,3 \pm 2,71
B	100 \pm 0,00	0,00	13,3 \pm 3,55	0,0	9,3 \pm 1,35	8,6 \pm 2,91
C	100 \pm 0,00	0,00	9,3 \pm 3,06	0,0	7,3 \pm 1,42	6,0 \pm 1,41
D	100 \pm 0,00	0,00	80,6 \pm 1,29	4,0 \pm 1,75	52,6 \pm 1,53	8,0 \pm 3,77

sentó un 92,6% de semillas embebidas. Esto permite presumir la manifestación de una dormición diferente a la causada por los tegumentos impermeables. En los estados menos avanzados de madurez (B, C y D) se registró el 100% de semillas embebidas y nula germinación. Luego de 5 días de desecación en el ambiente del laboratorio, el porcentaje de semillas embebidas disminuyó abruptamente en los estados de madurez A, B y C, con una manifestación más leve en el estado D (semillas obtenidas de los frutos con menor grado de madurez). Sólo se registró germinación, aunque en bajo porcentaje, en los tratamientos D y en el A con escarificado previo, indicando una cierta pérdida del estado de dormición endógena. La ausencia de germinación registrada en los demás tratamientos se atribuye a la elevada cantidad de semillas que perdieron la capacidad de imbibición por la progresiva impermeabilización de los tegumentos.

A los 48 días a partir de la cosecha se observó en la clase D una nueva disminución en la cantidad de semillas embebidas (el porcentaje de éstas cayó del 80,6% al 52,6%). En el resto de las clases se mantuvieron estables los valores registrados en el ensayo anterior. La germinación potencial, determinada en el tratamiento A escarificado, alcanzó un valor máximo (94,0%) indicando la pérdida completa del estado de dormición endógena.

Experiencia II)

En la primera evaluación (4 días después de la cosecha), los bajos porcentajes de germinación potencial en las semillas de los tres clones evidenció la presencia del estado de dormición endógena (Tabla 2). La semilla obtenida del clon 2 presentó mayor cantidad de semillas duras y mayor porcentaje de germinación potencial acumulada, que la cosechada de los otros clones (Tabla 2). Transcurridos 13 días a partir de la cosecha se incrementó la

cantidad de semillas impermeables en todos los materiales ensayados, siendo esto más evidente en los clones 25 y 26, lo que determinó uniformidad entre los tres clones evaluados. Por el contrario, éstos se diferenciaron en la germinación potencial. En el clon 2 se presentó el valor más alto (62,8%). A los 22 días después de la cosecha se determinaron valores muy similares en los porcentajes de semillas duras y en la germinación potencial de todos los materiales evaluados. Estos, al finalizar la experiencia, presentaron cerca del 90% de semillas impermeables. La germinación potencial alcanzó el 97,2% en el clon 2, mientras que en los otros fue algo menor.

DISCUSION

La rápida difusión natural de *Lt* en la región de la Pampa Deprimida Bonaerense conduce a suponer que, al menos en este ambiente, debe ser capaz de desarrollar estrategias que determinan una alta capacidad para aportar descendientes. Una de ellas es el elevado valor de resiembra evidenciado por la presencia de un importante banco de semillas en el suelo. Los mecanismos que regulan la germinación estarían involucrados en la eficacia de esta estrategia. Bajo las condiciones naturales la aparición de plántulas ocurre en forma escalonada durante el invierno, (Sevilla 1989). El efecto de la baja temperatura sobre el estado de dureza de las semillas determinaría la dinámica de este proceso (Mujica y Rumi, 1992). En esta experiencia se determinó que además de la impermeabilidad de los tegumentos existe otro tipo de dormición previa que también afecta la germinación. El comportamiento de las semillas que fueron cosechadas en el estado más avanzado de madurez (Tabla 1), demostró que inmediatamente después de la cosecha coexisten dos

Tabla 2 Evolución del porcentaje de semillas duras y de la germinación potencial en semillas cosechadas de tres clones en policruza de *L. tenuis*, durante 36 días después de la cosecha. Los valores son promedios \pm ES

Evolution of hard seeds percentage and potential germination in seeds harvested from three poly-cross clones of *L. tenuis*, 36 days after harvest. Values are average \pm SE.

Días pos-cosecha	Clon 25		Clon 26		Clon 2	
	Semillas duras (%)	Germinación potencial (%)	Semillas duras (%)	Germinación potencial (%)	Semillas duras (%)	Germinación potencial (%)
4	63,3 \pm 1,57	6,0 \pm 1,41	67,3 \pm 3,19	4,0 \pm 4,8	82,0 \pm 0,00	11,3 \pm 1,63
13	80,0 \pm 2,5	41,2 \pm 2,7	84,6 \pm 2,22	24,9 \pm 1,74	86,6 \pm 3,41	62,7 \pm 2,22
22	81,3 \pm 2,66	68,6 \pm 1,1	86,0 \pm 1,81	86,8 \pm 0,56	81,3 \pm 5,57	90,2 \pm 7,85
36	87,3 \pm 1,5	89,3 \pm 1,75	86,0 \pm 2,67	94,0 \pm 1,41	92,0 \pm 2,52	97,2 \pm 1,13

mecanismos de dormición que evolucionan en distinto sentido. La impermeabilidad de los tegumentos progresó hacia una expresión máxima, al mismo tiempo que el otro mecanismo de dormición más temprana y de tipo endógeno desapareció gradualmente. El comportamiento de los tres clones se manifestó de acuerdo con este patrón, a pesar de ciertas diferencias entre ellos (Tabla 2). Los valores de germinación potencial -superiores al 90%-registrados a los 22 y 36 días después de la cosecha, indican que el mecanismo de dormición endógena desaparecería sustancialmente a las 3-4 semanas y totalmente a las 5-6 semanas, coincidiendo con los resultados hallados en *Lc* (Li y Hill, 1989). Por otra parte, un día después de la cosecha se observó la presencia de semillas duras sólo en el estado más avanzado de madurez (Tabla 1). Dos semanas después de la cosecha de los frutos (maduros) de los clones (Tabla 2), el porcentaje de semillas duras alcanzó valores cercanos al máximo registrado en la experiencia. Esto indica que la impermeabilización de los tegumentos se manifestaría al finalizar el proceso de maduración, coincidiendo con la fase de deshidratación de las semillas en la

planta y aún luego de su esparcimiento. En otras especies la impermeabilidad de los tegumentos se ha relacionado con la deshidratación de las semillas durante su maduración (Raleigh, 1930; Helgeson, 1932; Hutton y Porter, 1937; Aitken, 1939; Quinlivan, 1968).

Se destaca que en ambas experiencias, esta situación se desarrolló mientras transcurrió el desecamiento natural de la semilla después de la cosecha, en las condiciones del laboratorio. La humedad relativa, una variable que no fue contemplada, podría condicionar la capacidad y la dinámica de la impermeabilización de los tegumentos durante la maduración de la semilla en la planta y también después de la cosecha. Se ha demostrado que la cantidad de semillas impermeables aumenta a medida que el contenido de humedad de las mismas decrece (Lebedeff, 1947; Harrington, 1949; Quinlivan, 1971). Este contenido es determinado por la humedad relativa y además por el tiempo en que las semillas son expuestas (Aitken, 1939; Harrington, 1949; Quinlivan, 1971). Surge el interrogante si este factor podría modificar la relación entre ambos mecanismos de dormición.

La ausencia de germinación en los estados menos avanzados de madurez indicaría que durante el proceso de maduración de las semillas, esta dormición endógena se presentaría antes que la dureza, coincidiendo con lo informado por Li y Hill (1989) en *Lc*. No obstante, los porcentajes de semillas de *Lt* con dormición endógena hallados en estas experiencias son mayores que los determinados por estos autores en *Lc*. Esto podría atribuirse a diferencias en la domesticación de ambas especies. La selección artificial ha ocurrido antes en *Lc* y una consuencia indirecta podría ser la pérdida parcial de la dormición endógena.

Llama la atención el bajo porcentaje de germinación observado en la clase D, teniendo en cuenta que la cantidad de semillas embebidas fue de 52,6%. Sería probable que la viabilidad del embrión haya sido afectada por la cosecha prematura de estas semillas. En *Lc* se ha determinado la presencia de semillas muertas cuando los frutos fueron cosechados a los 30 días o menos, a partir de la floración y que este efecto era mayor después de un período de presecado (Li y Hill, 1989).

Por otra parte, se observó variación entre los clones en la dinámica de ambos mecanismos, la impermeabilización de los tegumentos y la desaparición de la dormición endógena. Las mayores diferencias se presentaron al comienzo del período pos-cosecha evaluado. La variación observada entre los clones no modificó la coordinación de estos mecanismos.

La acción complementaria y parcialmente superpuesta de ambos mecanismos traerían como consecuencia el desplazamiento temporal y un gradualismo de la germinación. Mientras está presente la dormición endógena no pueden germinar las semillas viables que tienen la capacidad de embeberse. *Lc* y *Lt* presentan frutos muy dehiscentes, por lo tanto las semillas permanecen muy poco tiempo en estado maduro sobre la planta. Este tipo de dormición

endógena impide que las semillas maduras puedan germinar durante el breve período que son retenidas en la planta. Es deseable una dormición suficiente para evitar la germinación prematura de las semillas, pero que desaparezca rápidamente para no afectar las pruebas de calidad de las semillas ni la implantación del nuevo cultivo (Bewley y Black, 1982). El comportamiento observado en los materiales estudiados (Tablas 1 y 2) mostró que el estado de dormición endógena desapareció gradualmente y en forma espontánea durante un corto período después de la cosecha, bajo las condiciones del laboratorio. La breve duración de este estado disminuye la probabilidad de su detección, lo cual explica que no haya sido advertido antes. Su efecto podría tener también alguna trascendencia sobre la dinámica de la germinación en el suelo, aunque durante poco tiempo después de su ingreso al banco. Las semillas al ser ingeridas por los animales durante el pastoreo pierden la impermeabilidad de los tegumentos (Miñón *et al*, 1990). Estas podrían embeberse, impedidas de germinar hasta que se liberan de la dormición endógena, y quedar más expuestas al deterioro.

Los resultados indican que en *Lt* ambos mecanismos, la impermeabilidad de los tegumentos y la dormición endógena, serían concurrentes para prevenir la germinación inmediata de las semillas. Esta condición, cuya importancia ecológica sería la de regular la germinación en el banco de semillas del suelo, se podría encontrar ampliamente difundida en las poblaciones naturales de la especie, admitiendo cierta variación, posiblemente relacionada con la adaptación a diferentes ambientes.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen al CONICET por el apoyo económico brindado para relizar este trabajo.

BIBLIOGRAFIA

- Aitken Y** (1939) The problem of hard seeds in subterranean clover. *Proc Roy Soc Victoria* 51: 187-213.
- Bewley JD and M Black** (1982) Dormancy. En *Physiology and Biochemistry of Seeds in Relation to Germination*. Ed Springer-Verlag. Vol 2: 60-125.
- Brown CS** (1955) Hard seed in birdsfoot trefoil. Unpublished PhD thesis, Cornell University. Ithaca, New York
- Halgeson EA** (1932) Impermeability in mature and immature sweet clover seeds as affected by conditions of storage. *Trans Wisconsin Acad Sci* 27: 193-206.
- Grant WF and Zandstra H** (1968) The biosystematics of genus *Lotus* (Leguminosae) in Canada. II Numerical Chemotaxonomy. *Can J of Bot* 46: 585-589
- Harrington JF** (1949) Hard seeds in bean and other legumes. *Seed World* 64: 42-44
- Hutton ME and RH Porter** (1937) Seed impermeability and viability of native and introduced species of Leguminosae. *Iowa State Coll J Sci* 12: 5-24.
- Lebedeff GA** (1947) Studies on the inheritance of hard seeds in beans. *J Agric Res* 74: 205-215
- LI Q and Hill MJ** (1989) Seed development and dormancy characteristics in *Lotus corniculatus* L. *New Zealand J of Agric Res* 32: 333-336
- MacDonald HA** (1946) Birdsfoot trefoil (*Lotus corniculatus* L.) Its characteristics and potentialities as a forage legume. Cornell University Agriculture Experimental Station
- Miñon DP, GH Sevilla, L Montes y O Fernandez** (1990) *Lotus tenuis*: Leguminosa forrajera para la Pampa Deprimida. *Boletín Técnico Est Exp Agr Balcarce* N° 98:8
- Mujica MM y CP Rumi** (1991) Estado de dureza en semillas de *Lotus tenuis*: Efecto de las condiciones de conservación. *Rev de la Fac de Agr, La Plata*, 67:63-66
- Mujica MM y CP 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. *Rev de la Fac de Agr, La Plata*, 69: 69-75
- Quinlivan BJ** (1968) The softening of hard seeds of sandplain lupin (*Lupinus varius* L.). *Austr J Agric Res* 19: 507-515.
- Quinlivan BJ** (1971) Seed coat impermeability in legumes. *J Austr Ins Agr Res Sci* 37: 283-295
- Raleigh GJ** (1930) Chemical conditions in maturation, dormancy and germination of seeds of *Gymnocladus dioica*. *Bot Gaz (Crawfordville)* 93: 259-277.
- Sevilla G** (1989) Emergencia y establecimiento de *Lotus tenuis* en consociaciones con diferentes cultivares de *Festuca arundinacea* bajo dos regímenes de pastoreo por vacunos. Tesis M S Univ Nac de Mar del Plata. *Fac Cs Agr Balcarce* 158p