

Comunicación

Dinámica del estado de dureza de semillas de *Lotus tenuis* (Waldst et Kit) obtenidas del suelo en respuesta a un régimen de baja temperatura

María M Mujica* y Clara P Rumi**

* Área de Genética y Mejoramiento Animal y Vegetal,

**Instituto de Fisiología Vegetal. Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales, UNLP, CC 31, 1900 La Plata, Argentina

Recibido 20 enero de 1993; aceptado 20 de septiembre de 1993

Resumen

Se evaluó, bajo un régimen de baja temperatura ($5^{\circ}\text{C}\pm 2$), la dinámica de la pérdida del estado de dureza de semillas de *Lotus tenuis*, que han estado sometidas por períodos crecientes a las condiciones del "reservorio" del suelo durante el otoño e invierno.

Se determinó la evolución de la germinación de semillas extraídas mensualmente del "reservorio" del suelo y expuestas a: baja temperatura ($5^{\circ}\text{C}\pm 2$) y 2) a temperatura del laboratorio. Estas evaluaciones se realizaron a 21°C . El diseño experimental fue el totalmente aleatorizado con cuatro repeticiones de 50 semillas, dispuestas en cajas de Petri. Las muestras extraídas del campo presentaron valores bajos de germinación, menores al 5% en la mayoría de ellas. La extraída en el mes de agosto presentó el 22% de germinación, indicando la ocurrencia de un pico de respuesta a las condiciones naturales. La germinación potencial de la primera muestra extraída del "reservorio" del suelo fue de 99%. En las condiciones del laboratorio, las semillas permanecieron sin manifestar cambios significativos en la germinación, debido a que conservaron el estado de dureza. A $5^{\circ}\text{C}\pm 2$ todas las muestras respondieron alcanzando gradualmente valores cercanos a la germinación potencial, aunque se diferenciaron en el tiempo requerido. Las diferencias en la velocidad de la respuesta se atribuyen a la complementación de las condiciones del campo durante el otoño e invierno con el tratamiento de baja temperatura. Las muestras extraídas en abril, mayo y junio coincidieron en presentar su respuesta máxima en julio.

La baja temperatura es el factor determinante del ablandamiento de las semillas de *L. tenuis* en las condiciones naturales y las fluctuaciones diarias de la misma, por lo menos en la magnitud y modelo en que se producen, serían concomitantes en la ocurrencia del proceso pero no necesarias.

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

Dynamics of hard-seededness of *Lotus tenuis* (Waldst et Kit) obtained from soil in response to low temperature

Summary

The dynamics of hard-seededness loss of *L. tenuis* was assessed under low temperature conditions ($5^{\circ}\text{C}\pm 2$). The seeds have been naturally conditioned by increasing periods in the soil reservoir during Autumn and Winter.

Evolution of the germination percentage was assessed in seeds taken monthly from the soil reservoir and exposed to: low temperature ($5^{\circ}\text{C}\pm 2$) and laboratory temperature. Evaluations were performed in growth chamber at 21°C . Experimental design was completely randomized, performing four repetitions of 50 seeds in petri dishes. Samples taken from the field showed low germination values, less than 5 % in most cases. The sample taken in August showed 20 % of germination which indicated a peak response to natural conditions. Potential germination of the first sample taken from soil reservoir showed a value of 99 %. Under laboratory conditions, seeds showed no major changes in germination for they preserved their hardness. At $5^{\circ}\text{C}\pm 2$, all sample response was gradual, reaching values close to potential germination but at different times. Differences in speed response suggested a complementation of field conditions in Autumn/Winter with low temperature treatment. Samples obtained in April, May and June, all gave their maximum response in July.

Low temperature is the main factor determining *L. tenuis* seeds softening under natural conditions and their daily fluctuations, at least to the magnitude and pattern they are produced, would be concomitant to the process, but not necessary.

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

INTRODUCCION

Las semillas de *Lotus tenuis* son impermeables al agua por las características de sus tegumentos. En muestras cosechadas en forma manual, exentas del efecto abrasivo de la trilla mecánica, es frecuente encontrar más del 90% de semillas duras. El período reproductivo de esta especie abarca parte de la primavera y el verano. En esta última estación madura la semilla, que es cosechada o bien cae al suelo incrementando el banco o "reservorio" de semillas del pastizal natural. Sevilla (1989) y Miñón *et al.* (1990) observaron en una pastura que la distribución de la aparición de plántulas de *Lt* presentó un pequeño pico en el verano, mientras que el máximo se registró en agosto.

La temperatura es probablemente el

factor principal que regula la reversión del estado de dureza de las semillas que presentan esta característica, (Baskin y Baskin 1989). Varios autores han informado sobre el efecto de la amplitud de las fluctuaciones diarias de la temperatura durante el verano, sobre la reversión de la dureza de las semillas de especies cuya germinación ocurre principalmente en otoño; (Quinlivan, 1961; en *Lupinus digitatus*, *L. luteos*, *Medicago tribuloides* y *Trifolium subterraneum*; Sharma, *et al.*, 1984, en *Neptunea oleracea* y Mc Keon y Mott, 1982, 1984 en *Stylosanthes* spp).

Algunas especies de regiones templadas producen semillas duras que germinan en primavera. Poco es lo que se conoce sobre el proceso de ablandamiento de los tegumentos

por acción de las bajas temperaturas. Estudios preliminares en *Pedimelum subacaule* indican que bajas temperaturas (5°C) incrementaron la germinación de semillas permeables (Baskin y Baskin, 1989). Semillas de *Lt* conservadas por un periodo de 30 a 60 días a temperatura de $5-7^{\circ}\text{C}$ manifestaron cambios significativos en la permeabilidad de sus tegumentos (Mujica y Rumi, 1991). Los antecedentes conducen a inferir que las bajas temperaturas del otoño e invierno provocarían el ablandamiento de las semillas de esta especie y que las fluctuaciones diarias, normales del periodo, no serían necesarias para que este proceso ocurriera. De acuerdo con esta hipótesis, las semillas obtenidas del "reservorio" del suelo durante el otoño y comienzo del invierno, sometidas a un régimen de baja temperatura con un reducido rango de variación, deberían responder en su germinación con un patrón similar al observado por Sevilla (1989) en la aparición de plántulas en el campo. Además, el efecto de las condiciones imperantes en el estrato superior del suelo sobre los tegumentos expuestos por periodos crecientes durante el otoño e invierno, se complementaría con el del tratamiento de baja temperatura.

El objetivo de este trabajo fue evaluar, bajo un régimen de baja temperatura ($5^{\circ}\text{C}\pm 2$), la dinámica de la desaparición del estado de dureza de semillas de *Lt* sometidas por periodos crecientes, a las condiciones imperantes en el estrato superior suelo durante el otoño e invierno.

MATERIALES Y METODOS

En el otoño se implantó en la Estación Experimental J Hirschhom de los Hornos (Pcia de Buenos Aires), una parcela de *Lfcv* Tresur Chajá, que desarrolló su ciclo naturalmente sin la aplicación de ninguna práctica agrícola.

Antes de la siembra se verificó la ausencia de la especie en la parcela. Esta se hallaba ubicada en el sector más bajo del campo y permaneció la mayor parte del periodo de evaluación en condiciones de saturación hídrica. La experiencia se realizó el año siguiente al de la implantación.

Durante febrero y parte de marzo la parcela permaneció inundada por exceso de precipitaciones. Esto provocó la muerte de un gran número de plantas y demoró el comienzo de la experiencia. En la figura 1 se presentan las temperaturas máxima, media y mínima; medias mensuales del periodo evaluado en la Estación Experimental.

Mensualmente, a partir de abril hasta

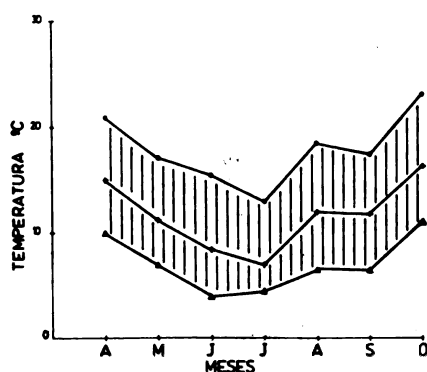


Figura 1- Evolución de las temperaturas máxima (●), media (+) y mínima (▲) medias mensuales en la Estación Experimental durante el periodo de evaluación.

Figure 1- Evolution of maximum (●), medium (+) and minimum (▲) monthly average temperature at the Experimental Station during the assessment period.

octubre, se ubicaron 4 sitios al azar dentro de la parcela. En cada uno se tomó una muestra de la superficie del suelo de 30 cm de diámetro y aproximadamente 2 cm de profundidad. Estas fueron unificadas y homogeneizadas, constituyendo una muestra mensual única.

Los sitios de cada extracción quedaron señalados para evitar superposiciones con los muestreos posteriores. Las semillas fueron separadas de la tierra y restos vegetales por lavado con agua corriente a través de diferentes tamices y se secaron al aire. La mitad de la muestra de semilla obtenida cada mes, se colocó en un sobre de papel dentro de un recipiente metálico hermético y se mantuvo en una heladera regulada a $5^{\circ}\text{C}\pm 2$. La otra mitad fue conservada en la misma forma en el ambiente del laboratorio, donde la temperatura varió entre 17 y 24°C . En la primera muestra se determinó la germinación potencial, para lo cual una porción de semillas fue escarificada mecánicamente. Este valor indicó la máxima respuesta posible que se podía esperar por efecto del tratamiento. Mensualmente, coincidiendo con cada toma de muestra del "reservorio" de semillas del suelo, se evaluó la germinación de la muestra obtenida en la fecha, y de las muestras precedentes que se mantuvieron: 1) a baja temperatura ($5^{\circ}\text{C}\pm 2$) y 2) en el ambiente del laboratorio. Estas evaluaciones se realizaron a 21°C . El diseño experimental fue el totalmente aleatorizado con cuatro repeticiones de 50 semillas dispuestas en cajas de Petri. Diariamente, durante una semana, se registró el número de semillas germinadas (longitud de radícula 2mm). El 1º y el 7º día se registró, además, el nº de semillas no embebidas y embebidas, pero no germinadas. Las semillas embebidas se distinguieron por su mayor volumen, brillo y color pardo más pálido.

RESULTADOS

La evolución de las temperaturas máxima, media y mínima medias mensuales (Fig. 1), muestra que ellas fueron variables durante el periodo evaluado, excepto en agosto

y septiembre, que se mantuvieron estables. La temperatura mínima media mensual más baja se registró en junio. Las temperaturas media y máxima, medias mensuales más bajas se registraron en julio.

En la figura 2 se observa que el porcentaje de germinación de las muestras, en el momento en que fueron obtenidas del "reservorio" del suelo, no superó el 5%, excepto en la que corresponde al mes de agosto que alcanzó el 22%. En todos los casos las semillas que no germinaron permanecieron sin embeberse. Las porciones de estas muestras, que fueron conservadas en el ambiente del laboratorio, mantuvieron estos valores hasta que finalizó la experiencia. En la figura 2 se presentan los correspondientes a la muestra extraída en abril. La germinación potencial de esta muestra al comienzo de la experiencia fue del 99%.

Todas las muestras extraídas del campo

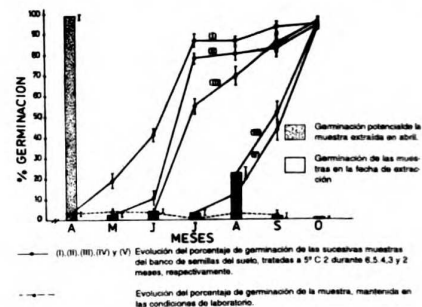


Figura 2. Dinámica del ablandamiento de semillas de *Lotus tenuis* del reservorio del suelo, en respuesta a un tratamiento de baja temperatura ($5^{\circ}\text{C}\pm 2$). Las líneas verticales representan $\pm\text{SE}$.

(I),(II),(III),(IV) y (V): evolución del porcentaje de germinación de las sucesivas muestras del reservorio de semillas del suelo, tratadas a baja temperatura ($5^{\circ}\text{C}\pm 2$) durante 6, 5, 4, 3 y 2 meses respectivamente.

Dynamics of *Lotus tenuis* soil reservoir seeds softening as a response to low temperature treatment ($5^{\circ}\text{C}\pm 2$). Vertical lines represent $\pm\text{SE}$.

(I),(II),(III),(IV) and (V): evolution of germination percentage in successive samples of the soil seed reservoir treated at low temperature ($5^{\circ}\text{C}\pm 2$) during 6, 5, 4, 3 and 2 months, respectively.

respondieron significativamente al tratamiento de baja temperatura. La primera, obtenida en abril, alcanzó el 93,5% de germinación en setiembre (5 meses de tratamiento). El resto superó el 90% en el mes de octubre (5, 4, 3 y 2 meses de tratamiento).

En la figura 3 se observa que en respuesta al tratamiento de baja temperatura las semillas de abril, mayo y junio presentaron los máximos incrementos mensuales de germinación en un período de tiempo decreciente a medida que se prolongó su permanencia en el suelo. Estas muestras presentaron el mayor porcentaje de germinación mensual (máximo incremento) en julio (con 3, 2 y 1 mes de tratamiento, respectivamente). Posteriormente, los incrementos decrecieron abruptamente, manteniendo valores bajos, hasta alcanzar la máxima respuesta. Las muestras de julio y agosto, a diferencia de las anteriores, presentaron un patrón de respuesta conformado sólo con incrementos crecientes del porcentaje de germinación mensual.

Según lo indica el valor de su germi-

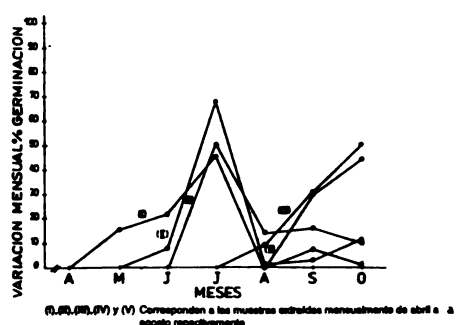


Figura 3. Variación del porcentaje de germinación mensual de las muestras extraídas del campo y expuestas a baja temperatura ($5^{\circ}\text{C}\pm 2$).

Monthly variation of germination percentage of samples taken from the field and exposed to low temperature ($5^{\circ}\text{C}\pm 2$).

nación potencial (Fig 2), la viabilidad de las semillas de abril fue máxima. Al finalizar el tratamiento de baja temperatura, en el mes de octubre, el porcentaje de germinación fue mayor al 90% en todas las muestras. Esto demuestra que la viabilidad de las semillas se mantuvo bajo este régimen, y que también ocurrió lo mismo en el "reservorio" del suelo, por lo menos con las semillas duras durante todo el invierno.

DISCUSION

Los resultados obtenidos por Sevilla (1989) sobre la aparición de plántulas de *Lt* en una pastura, indican que un pequeño porcentaje del banco de semillas germina durante el verano. El resto permanece en el suelo, hasta que gradualmente alcanza el estado que permite su germinación produciendo la máxima emergencia de plántulas en agosto.

El rango medio de variación de la temperatura en el campo, durante los meses de junio y julio fue determinado por una temperatura máxima media de $13-15^{\circ}\text{C}$ y mínima media de $4-5^{\circ}\text{C}$ (Fig1). Su efecto habría sido trascendente en la manifestación del comportamiento observado en la muestra obtenida en agosto (Fig 2). Esta presentó un 22% de germinación, el valor más alto registrado en la experiencia, indicando la posible ocurrencia del máximo pico de ablandamiento en el banco de semillas del suelo. Un mes después, al obtener la muestra de setiembre, se observó la presencia de numerosas plántulas en la parcela. Estos resultados concuerdan con los comunicados por Sevilla (1989), en que la respuesta más significativa a las condiciones naturales se produciría al finalizar el invierno. Difieren en que la máxima frecuencia de aparición de

plántulas se habría producido un mes más tarde. Esto no llama la atención por tratarse de años y localidades distintas. La germinación del resto de las muestras, en el momento en que fueron obtenidas en el campo, no superó el 5% (Fig 2). Aun así, los resultados indican la presencia de semillas con capacidad de embeberse y germinar en el "reservorio del suelo", durante el período evaluado. En la mayor parte de la experiencia la humedad del suelo no fue limitativa para la germinación. La presencia de plántulas en el campo, presentando diferentes estados fenológicos, indicó que el régimen térmico del invierno no fue inhibitorio. Esto implica que el porcentaje de germinación de cada muestra, no representa a la totalidad de las semillas que ha perdido el estado de dureza durante el período de la experiencia. Tampoco entre dos muestreos sucesivos. Probablemente sólo detecte el ablandamiento ocurrido en un breve período previo a la extracción.

La temperatura de $5^{\circ}\text{C}\pm 2$ provocó en las semillas obtenidas en el campo durante el otoño y comienzo del invierno, una evolución de la germinación que fue similar a la que se produciría en las condiciones naturales durante el invierno. Las tres primeras muestras extraídas del campo presentaron el pico máximo de germinación en julio (Fig 3), concordando con los resultados de Sevilla (1989). El comportamiento de la sucesión de muestras expuestas a baja temperatura, mostró que el efecto de las condiciones naturales se complementó con el del tratamiento. La respuesta fue más rápida a medida que las semillas permanecieron más tiempo en el campo (Figs 2 y 3).

La graduación de la respuesta, especialmente de la muestra de abril, indica la existencia de semillas que difieren en la velocidad de

ablandamiento de sus tegumentos.

Las semillas del "reservorio" del suelo obtenidas en julio y agosto presentaron un modelo de respuesta nítidamente diferenciado de las anteriores (Figs 2 y 3). El origen de estas diferencias podría relacionarse con factores cuya acción previa condicionara el efecto de las bajas temperaturas. Según Baskin y Baskin (1989) las altas temperaturas del verano incrementan en *Pedimelum subcaule* el porcentaje de semillas que se vuelven permeables a 5°C . La distribución de la producción de semillas de *Lf* abarca todo el verano y presenta generalmente 2 y hasta 3 picos de jerarquía decreciente (Mujica y Rumi, comun. pers. 1991). Este patrón de la producción de semilla podría permitir la diferenciación de subpoblaciones en relación al efecto de algún factor condicionante del grado de dureza, que operara durante el verano.

El tratamiento de $5^{\circ}\text{C}\pm 2$ fue más efectivo que las condiciones naturales para revertir totalmente el estado de dureza de las semillas. La muestra obtenida en abril, bajo el tratamiento aplicado, presentó más del 90% de germinación en septiembre. En el campo, se extrajeron muestras con un alto contenido de semillas duras en setiembre y octubre. Esto conduce a suponer que en las condiciones naturales el período de bajas temperaturas no fue suficiente para una parte de la población, que completaría su proceso de ablandamiento al año siguiente.

En el campo, el régimen térmico incluyó a otras temperaturas mayores y menores a la aplicada. El proceso de ablandamiento ocurrió durante el otoño e invierno en estas condiciones. Esto podría implicar que otras temperaturas también habrían sido efectivas, por lo menos para una parte de las semillas del suelo, aunque en distinto grado.

CONCLUSIONES

-La baja temperatura sería el factor determinante natural del ablandamiento de las semillas de *Lt.* La fluctuación diaria de la misma, por lo menos en la magnitud y patrón con que ocurre, sería sólo concomitante en este proceso bajo las condiciones naturales.

-Además de la temperatura ensayada, debe existir un rango de temperaturas efectivas para eliminar el estado de dureza de las semillas

de *Lt.* Es posible que ese rango incluya a temperaturas que sean más o menos efectivas en el ablandamiento.

-Bajo el régimen térmico natural una parte de las semillas del banco, conservó el estado de dureza hasta la primavera, implicando la posibilidad que su ablandamiento se produzca en el siguiente período de bajas temperaturas en el otoño e invierno.

BIBLIOGRAFIA

Baskin JM and CC Baskin (1989) Physiology of dormancy and germination in relation to seed bank ecology. En: Ecology of soil seed banks. Ed MA Leck, VT Parker y RL Simpson Academic Press 53-66

McKeon GM and JJ Mott (1982) The effect of temperature on the field softening of hard seed of *Stylosanthes humilis* and *S. lanata* in a dry monsoonal climate. Aust J Agric Res 33: 75-85

McKeon GM and JJ Mott (1984) Seed biology of *Stylosanthes*. En The biology and Agronomy of *Stylosanthes*. Ed HM Stace y LA Edyc Academic Press Sydney 311-332

Mifon 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 las semillas de *Lotus tenuis*: efecto de las condiciones de conservación. Rev de la Fac de Agr, Univ Nac de La Plata, 67: 63-66

Quinlivan BJ (1961) The effect of constant and fluctuating temperatures on the permeability of hard seeds of some legume species. Aust J Agric Res 12: 1009-1022

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 MS Univ Nac de Mar del Plata. Fac Cs Agr Balcarce 158p

Sharma KP, TI Khan and N Bhardraj (1984) Temperature regulated seed germination in *Neptunia oleracea* (Lour) and its ecological significance. Aquat Bot 20: 185-188