

El crecimiento inicial de *Lotus glaber* afectado por la remoción y el sombreado de los cotiledones

M. M. MUJICA* & C. P. RUMI**

*Area de Genética y Mejoramiento Animal y Vegetal, **Instituto de Fisiología Vegetal. Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales, UNLP, CC 31 (1900) La Plata, Argentina
E-mail: infive@isis.unlp.edu.ar

MUJICA M. M. & C. P. RUMI. 1998. El crecimiento inicial de *Lotus glaber* afectado por la remoción y el sombreado de los cotiledones. Rev. Fac. Agron., La Plata 103 (2): 127-133.

El objetivo de este estudio fue evaluar en plántulas de *Lotus glaber* (= *Lotus tenuis*): (I) El efecto de la remoción y el sombreado de los cotiledones, sobre el vigor de las plántulas, y otros caracteres condicionantes de la implantación, y (II) La evolución del crecimiento de los cotiledones durante el período experimental. La experiencia se realizó bajo una vidriera. Se sembró semilla de una población natural en macetas con tierra homogeneizada. Los tratamientos fueron, a) la remoción de los cotiledones en tres estadios de desarrollo foliar (cotiledones, 1ª hoja y 2ª hoja desplegadas) y b) el sombreado de los mismos, desde esos estadios hasta la evaluación final realizada a los 35 días de la siembra. El testigo conservó los cotiledones intactos y expuestos a luz natural plena. El sombreado de los cotiledones en el estadio de "cotiledones desplegados" tuvo un efecto negativo sobre: peso seco (total, aéreo y radical); área foliar; longitud del eje principal y raíz; número de tallos en la corona; número de hojas desplegadas, y relación área foliar/longitud de raíz. Además, determinó un mayor número de hojas con menos de 5 folíolos y una mayor longitud del hipocotilo. El carácter más afectado, fue la longitud de raíz. La remoción de los cotiledones en los tres estadios, afectó el peso seco total y los demás caracteres evaluados. Desde su despliegue hasta el de la 1ª hoja, los cotiledones incrementaron 74, 108 y 28% en peso seco, área y espesor, respectivamente. A partir de ese momento su crecimiento se detuvo. Los resultados resaltan los roles directos e indirectos de los cotiledones en la implantación de *L. glaber*, no sólo en relación al vigor de las plántulas sino en su capacidad de exploración del sustrato.

Palabras clave: vigor de plántula, alargamiento del hipocotilo, crecimiento de los cotiledones, sombreado de los cotiledones, remoción de los cotiledones.

MUJICA M. M. & C. P. RUMI. 1998. The initial growth of *Lotus glaber* affected by the cotyledon removal and shading. Rev. Fac. Agron., La Plata 103 (2): 127-133.

The objective of this study was to determine in *Lotus glaber* (= *Lotus tenuis*) seedlings: I) The effect of removal and shading of cotyledons on seedling vigor determination and on other characters that could conditioned the establishment, and II) The evolution of the cotyledon growth during the experimental period. The experiment was performed in a glasshouse. Seeds from a natural population were sown in pots with homogeneous soil. The treatments consisted in the cotyledon removal when the seedlings showed the stages of: unfolded cotyledons, and 1st and 2nd unfolded leaves, and the shading at the same stages until the end of the experiment, 35 days after sowing. The control kept cotyledon untouched and exposed to the full daylight. Darkness in the unfolded cotyledon stages had a negative effect over total, aerial and radical dry weights; foliar area; principal axe and root lenght; number of stems in the crown; number of unfolded leaves, and foliar area/root lenght ratio. In addition, darkness determined a greater number of leaves with less than 5 leaflets and an increase in the lenght of the hypocotyl. The most affected character was root length. Cotyledon removal in the three stages strongly affected the total dry weight and the other evaluated characters. From their unfolded until to unfolded 1st leaf stage, the cotyledon increased 74, 108, and 28% in their dry weight, area and thickness, respectively. Starting from that moment their growth stopped. The results stand out the direct and indirect roleplaying of the cotyledons in the establishment of *L. glaber*, not only in relation to the seedling vigor but also in the capacity to explore the substratum.

Key words: seedling vigor, hypocotyl lengthening, cotyledon growth, cotyledon shading, cotyledon removal.

INTRODUCCIÓN

En *Lotus glaber* Mill. (= *Lotus tenuis* Waldst. et Kit. ex Wild.) interesa mejorar el vigor de las plántulas para lograr una buena implantación en el campo. Qualls & Cooper (1968), indican que el vigor de la plántula está generalmente caracterizado por el peso seco de la misma, después de un período de crecimiento en un ambiente dado.

En numerosas especies forrajeras, el vigor se encuentra frecuentemente asociado con el tamaño de las semillas. En *L. glaber* y *L. corniculatus* L. existen evidencias de la existencia de correlaciones positivas y altamente significativas entre el vigor de las plántulas y el peso de las semillas (Beuselinck & McGraw, 1983). Además, en *L. corniculatus* Fonseca et al., (1990) establecieron que el tamaño de las semillas es determinado por el número y/o tamaño de las células de los cotiledones.

Durante los primeros estadios del crecimiento de las plántulas los cotiledones movilizan y transfieren sus reservas. Si éstos son epigeos, como en el caso de *L. glaber* y *L. corniculatus*, además de aportar sus reservas, después de la emergencia sintetizan fotoasimilados. Lovell & Moore (1970), señalan que los cotiledones epigeos proveen un área fotosintética antes que las hojas verdaderas y que la adaptación de estos órganos a la función asimilatoria define una estrategia de crecimiento de la plántula. La adaptación de los cotiledones como órganos fotosintéticos se relaciona con su habilidad para expandirse después de la emergencia, la cual varía entre las especies epigeas. En el poroto (*Phaseolus vulgaris* L.), los cotiledones son de corta vida, no muestran una expansión significativa, su actividad fotosintética es escasa, y pierden peso seco rápidamente (Opik & Simon, 1963; Opik, 1966). En otras leguminosas los cotiledones presentan una expansión moderada, con una lenta pérdida de peso seco, como ocurre en el lupino (*Lupinus albus* L.) o bien, se expanden hasta tres veces su tama-

ño original, con un aumento del peso seco como en el caso del trébol rojo (*Trifolium pratense* L.), (Lovell & Moore, 1970). La modalidad funcional de los cotiledones condicionaría su importancia en la determinación del vigor de las plántulas de una especie. En *L. glaber* no se conoce el efecto de las funciones de los cotiledones sobre el crecimiento de las plántulas en la etapa de pos-emergencia.

En esta experiencia se intenta validar la hipótesis de que los cotiledones epigeos de *L. glaber*, juegan un papel estratégico en la supervivencia y habilidad competitiva de las plántulas, basado en su doble función de fuente de reservas y de fotoasimilados en la primera fase del crecimiento. Para ello se evaluó en plántulas pos-emergentes de *L. glaber*: (I) El efecto de la remoción y el sombreado de los cotiledones en el vigor, expresado por el peso seco total de las plántulas, y en otros caracteres condicionantes de la implantación (longitud del hipocótilo, área foliar, número de tallos en la corona, número de hojas desplegadas, longitud de la raíz, relación entre peso seco aéreo y radical, relación entre el área foliar y longitud de la raíz, y relación entre el peso seco de hojas y área foliar) y (II) La evolución, durante el período experimental, de los componentes del crecimiento de los cotiledones (área, peso seco y espesor).

MATERIALES Y MÉTODOS

En la experiencia se utilizó semilla cosechada manualmente en una población natural del partido de Brandsen, provincia de Buenos Aires, Argentina. La semilla fue conservada en heladera durante 7 meses hasta que se inició la experiencia en una vidriera. Las condiciones de baja temperatura durante la conservación determinaron que no fuera necesaria la escarificación (Mujica & Rumi, 1991). La siembra se realizó a una profundidad uniforme de 5 mm en un sustrato homogeneizado compuesto de tierra y arena (3:1) en recipientes

de plástico de 300 cm³ de capacidad. Se sembró una semilla por pote para evitar el raleo. El diseño experimental fue totalmente aleatorizado, con dos repeticiones. La unidad experimental fue de 5 plántulas. Los tratamientos evaluados fueron: a) Remoción de los cotiledones por un corte en su extremo basal cuando más del 50% de las plántulas alcanzaron los siguientes estadios de desarrollo foliar: (1), cotiledones desplegados; (2), 1^a hoja desplegada; (3), 2^a hoja desplegada y b) Sombreado de los cotiledones desde los estadios (1), (2) y (3) hasta finalizar la experiencia. Para sombrear los cotiledones se colocó sobre cada uno de ellos una pantalla de aluminio laminado sostenida mediante su inserción en el sustrato, lo que permitió su elevación a medida que se alargaba el hipocotilo. De esta forma se obtuvo la condición de sombreado sin ejercer presión sobre los cotiledones, ni interferir en el crecimiento del hipocotilo. En el testigo los cotiledones se conservaron intactos y expuestos a la luz natural plena de las condiciones de la experiencia.

La humedad del sustrato se mantuvo por riegos periódicos. Al finalizar la experiencia, 35 días después de la siembra, se cosecharon las plántulas y las raíces fueron separadas del sustrato mediante una corriente de agua sobre un tamiz fino. En cada una de las plántulas se determinó: longitud del eje principal, longitud del hipocotilo, longitud máxima de la raíz, número de tallos de la corona, número de hojas desplegadas, número de hojas con menos de 5 folíolos, área foliar (excluidos los cotiledones), peso seco de raíz, peso seco de tallos y peso seco de hojas. Los valores de área foliar y peso seco se determinaron para cada unidad experimental (el conjunto de 5 plántulas). Se determinaron área foliar, peso seco aéreo, peso seco total y las relaciones: peso seco aéreo/peso seco raíz; área foliar/longitud de raíz, y peso seco hojas/área foliar.

Los cotiledones de las plántulas sometidas a los tratamientos (a), removidos en cada uno de los estadios indicados, se utilizaron

para realizar las siguientes determinaciones: área, peso seco y espesor. El área y el peso seco se determinaron sobre el conjunto de 10 cotiledones (un cotiledón por plántula, c/u de las 10 que correspondían a cada tratamiento). Los 10 cotiledones restantes se destinaron a la determinación del espesor de los mismos por el análisis microscópico de transortes realizados en su parte media. El área de los cotiledones y la foliar se midió con un integrador de área LICOR LI 3100.

El efecto de los tratamientos se evaluó por el análisis de la varianza y el test de Tukey a dos niveles de significación ($\alpha = 0,05$; $\alpha = 0,01$).

RESULTADOS

Tanto la remoción como el sombreado de los cotiledones, en todos los estadios de desarrollo foliar considerados, redujeron la longitud de la raíz ($P < 0,01$) (Tabla 1). Sin embargo, la longitud del eje principal se redujo especialmente cuando los tratamientos se aplicaron en el estadio (1). El alargamiento del hipocotilo resultó estimulado por la remoción de los cotiledones en los tres estadios considerados y por el sombreado en el estadio de cotiledones desplegados ($P < 0,01$). El número de tallos en la corona se redujo por efecto de la remoción en los estadios (1) y (2) y por el sombreado en el estadio (1), ($P < 0,01$). El nº de hojas desplegadas resultó menor por la remoción y el sombreado en el estadio (1), ($P < 0,01$). También se observó una mayor cantidad de hojas con menos de 5 folíolos por la remoción y el sombreado en estadio (1), ($P < 0,01$) y ($P < 0,05$), respectivamente.

El peso seco total (Fig. 1 a) y radicular (Fig. 1 b) fueron deprimidos por la remoción de los cotiledones en los tres estadios de desarrollo foliar considerados y por el sombreado a partir del estadio de cotiledones desplegados, ($P < 0,01$). El área foliar resultó disminuida ($P < 0,01$) sólo por la remoción y el som-

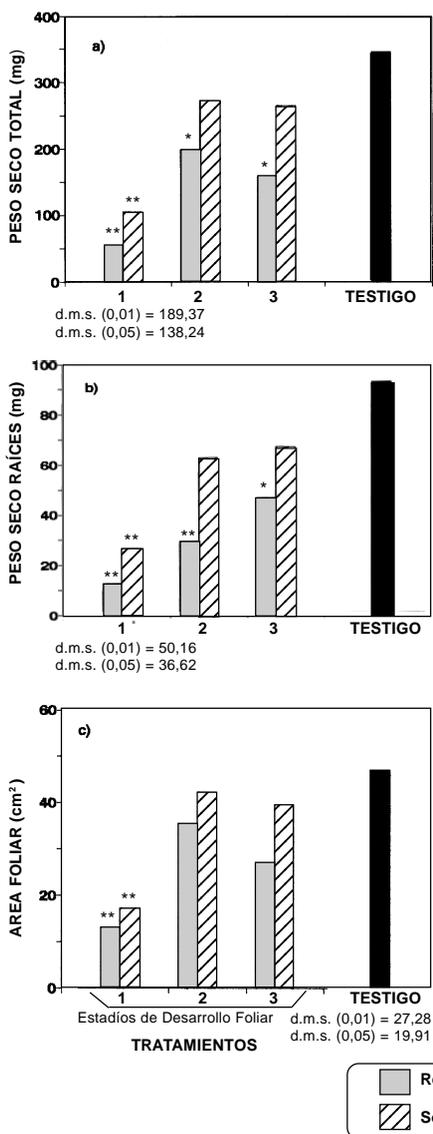


Figura 1. Efecto de la remoción y del sombreado de los cotiledones de plántulas en *L. glaber* en tres estadios de desarrollo foliar (cotiledones desplegados (1), 1ª hoja desplegada (2) y 2ª hoja desplegada (3)), sobre: a) peso seco total; b) peso seco raíces; c) área foliar. Unidad experimental= 5 plántulas, n=2. Las medias que difieren del testigo ($P<0,01$) y ($P<0,05$) son indicadas con ** y *, respectivamente.

Effect of cotyledon removal and shading on *L. glaber* seedlings, in three stages of foliar development (unfolded cotyledons (1), unfolded 1st leaf (2) and unfolded 2nd leaf (3)), on: a) total dry weight; b) root dry weight; c) foliar area. Experimental unit=5 seedlings, n=2. The means that differ from the control ($P<0,01$) and ($P<0,05$) are indicated with ** and *, respectively.

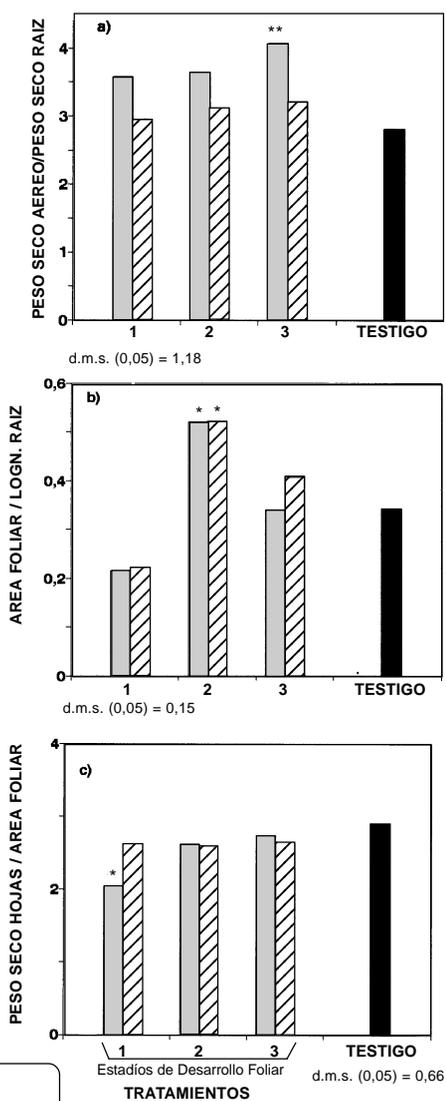


Figura 2. Efecto de la remoción y el sombreado de los cotiledones en plántulas de *L. glaber* en tres estadios de desarrollo foliar (cotiledones desplegados (1), 1ª hoja desplegada (2) y 2ª hoja desplegada (3)), sobre las relaciones: a) peso seco aéreo/peso seco de raíz; b) área foliar/ longitud de raíz y c) peso seco de hojas/ área foliar. Las medias que difieren del testigo ($P<0,05$) son indicadas con *.

Effect of cotyledon removal and shading in *L. glaber* seedlings, in three different stages of foliar development (unfolded cotyledon (1), unfolded 1st leaf (2) and unfolded 2nd leaf (3)), on the ratios: a) aerial dry weight/root dry weight; b) foliar area/root length and c) leaves dry weight/foliar area. The means that differ from the control ($P<0,05$) are indicated with *.

Tabla 1. Efecto de la remoción y el sombreado de los cotiledones en plántulas de *L. glaber* en tres diferentes estadios de desarrollo foliar, sobre la longitud del eje principal, el hipocotilo y la raíz; la producción de tallos en la corona, y la morfología de las hojas. Los valores son medias \pm ES (n=2). Las medias que difieren del testigo ($P<0,01$) y ($P<0,05$) son indicadas con (**) y (*) respectivamente.

*Effect of cotyledon removal and shading in L. glaber seedlings at three different stages of foliar development on the principal axe, hypocotyl and root length; the stem production in the crown and the foliar morphology. The values are means \pm SE (n=2). The means that differ from the control ($P<0.01$) and ($P<0.05$) are indicated with (**) and (*) respectively.*

Tratamientos	Long. de la raíz (cm)	Long. eje principal (cm)	Long. del hipocótilo (mm)	Nº de tallos en la corona	Nº de hojas desplegadas	Nº de hojas < 5 folíolos
Remoción en los estadios						
(1): Cotiledones desplegados	12,24**	6,09 \pm 0,17**	9,27 \pm 0,40**	1,00**	5,80**	4,80 \pm 0,40**
(2): 1ª hoja desplegada	16,96 \pm 2,62**	10,76 \pm 0,57*	8,40 \pm 0,50**	2,20 \pm 0,02**	6,90 \pm 0,10*	3,55 \pm 0,23
(3): 2ª hoja desplegada	16,21 \pm 1,41**	13,01 \pm 0,50	9,10 \pm 0,30**	3,44 \pm 0,27	8,11 \pm 0,12	3,50 \pm 0,10
Sombreado a partir de los estadios						
(1): Cotiledones desplegados	16,21 \pm 0,93**	8,99 \pm 1,01**	9,80 \pm 0,20**	1,80 \pm 0,20**	6,30 \pm 0,30**	4,50 \pm 0,10*
(2): 1ª hoja desplegada	17,95 \pm 0,15**	14,45 \pm 0,57	6,17 \pm 0,42	3,50 \pm 0,30	8,00 \pm 0,20	3,40 \pm 0,20
(3): 2ª hoja desplegada	17,81 \pm 0,13**	14,72 \pm 1,38	6,97 \pm 0,22	3,50 \pm 0,30	8,20 \pm 0,40	3,20 \pm 0,10
Testigo	27,25 \pm 0,23	15,26 \pm 0,31	5,85 \pm 0,22	3,80	8,20 \pm 0,20	3,20 \pm 0,10
d.m.s. _{0,05}	(6,65)	(4,21)	(1,92)	(1,15)	(1,26)	(1,15)
_{0,01}	(9,11)	(5,72)	(2,63)	(1,58)	(1,73)	(1,58)

breado de los cotiledones en el estadio de cotiledones desplegados (Fig. 1 c).

La asignación de recursos a la parte aérea aumentó ($P<0,01$) por efecto de la remoción de los cotiledones cuando estaba desplegada la 2ª hoja (Fig. 2 a), y la relación área foliar/longitud de raíz ($P<0,05$) por remoción y el sombreado de los cotiledones cuando estaba desplegada la 1ª hoja (Fig. 2 b). Además, la relación peso seco hojas/área foliar disminuyó sólo como respuesta a la remoción en el estadio de cotiledones desplegados ($P<0,05$) (Fig. 2 c).

Desde que se desplegaron, hasta que se desplegó la 1ª hoja, el crecimiento de los coti-

ledones determinó aumentos de 108, 74 y 28 %, en su área, peso seco y espesor, respectivamente. A partir del momento en que se expandió la 1ª hoja el crecimiento se detuvo.

DISCUSIÓN

En la experiencia se registró un importante crecimiento de los cotiledones de *L. glaber* durante el período cotiledones - 1ª hoja desplegados, expresado por el incremento del peso seco, y sobre todo por la expansión del área de los mismos. En otras especies epigeas los cotiledones con una baja o nula ex-

pansión del área son considerados como poco adaptados a la fotosíntesis (Lovell & Moore, 1970). No obstante, en *Desmodium paniculatum* D. C. el principal determinante del vigor de las plántulas fue el peso de los cotiledones epigeos y no su área. Además, cuando éstos fueron sombreados hasta el punto de compensación lumínica, no hubo efecto sobre el crecimiento de las plántulas (Wulff, 1986). En esta experiencia con *L. glaber* el aumento del peso seco de los cotiledones, hasta el despliegue de la 1ª hoja, se puede atribuir fundamentalmente a la síntesis de fotoasimilados realizada por ellos, ya que la 1ª hoja aún no se había desplegado. Cuando esta actividad fue anulada por el sombreado en el estadio de cotiledones desplegados el peso seco total de las plántulas sólo alcanzó el 30,4 % del correspondiente al testigo. En esta experiencia no se determinó el punto de compensación lumínica y, por lo tanto, el sombreado de los cotiledones no se realizó bajo esta condición. Esto implica que la magnitud del efecto de este tratamiento debe ser considerada con esta restricción.

El sistema radical resultó afectado en su longitud y peso seco tanto por la remoción como por el sombreado. Esto sugiere que la raíz sería el destino de mayor demanda de lo sintetizado por los cotiledones, por lo menos hasta el estadio de 2ª hoja desplegada. El marcado efecto sobre la longitud de la raíz resalta que los cotiledones condicionan el establecimiento de las plántulas, no sólo por influir sobre el vigor expresado por la acumulación de peso seco sino también por permitir una mayor exploración del sustrato.

El sombreado de los cotiledones aplicado en el momento de su despliegue determinó plántulas con menos hojas desplegadas y, su remoción, plántulas con un mayor número de hojas con menos de cinco folíolos. Esto sugiere que pueden condicionar procesos relacionados con la morfogénesis foliar. La remoción y el sombreado en el estadio de cotiledones desplegados disminuyeron el número de

tallos en la corona de las plántulas, un carácter que podría ser estratégico en la competencia por el espacio aéreo.

Es destacable el estímulo que la remoción de los cotiledones en todos los estadios, y el sombreado en el estadio de cotiledones desplegados, ejercieron sobre el alargamiento del hipocotilo. En plántulas no ahiladas de varias especies se ha comprobado que los cotiledones participan en la inhibición del alargamiento del hipocotilo (Black & Shuttleworth, 1976), especialmente por la percepción de la luz roja (Black & Shuttleworth, 1974). En concordancia, los resultados de esta experiencia sugieren que los cotiledones de *L. glaber* apenas emergen, actuarían como fotosensores capaces de regular el crecimiento del hipocotilo. Esto podría implicar una expresión precoz de habilidad para la competencia por la luz y una muestra más de su adaptación a funciones similares a las foliares.

La relación área foliar/longitud de raíz resultó alterada tanto por el sombreado como por la remoción de los cotiledones en el estadio de 1ª hoja desplegada. Las plántulas reaccionaron deprimiendo más el alargamiento de la raíz que la producción de área foliar. Una alta relación área foliar/longitud de raíz implicaría poca habilidad para sobrevivir cuando la disponibilidad de agua en el suelo es escasa.

Los resultados sugieren que la capacidad fotosintética de los cotiledones podría ser trascendente en la determinación del vigor de las plántulas y también de otros caracteres relacionados con la implantación, por lo tanto es importante evitar su depredación como ha sido destacado por Wulff (1986) en relación a la implantación de *D. paniculatum*. Además, en el caso de *L. glaber*, también sería conveniente evitar el sombreado de los cotiledones, que podría ocurrir cuando las plántulas emergen debajo de la broza o de individuos de otras especies en un pastizal. El mayor flujo de emergencia de las plántulas de *L. glaber* desde el reservorio de semillas del suelo ocurre a fines del invierno (Sevilla, 1989; Mujica & Rumi,

1993). Una intensa defoliación del pastizal en ese período minimizaría el sombreado de los cotiledones y, por lo tanto, favorecería la implantación de la nueva generación.

Fonseca *et al.*, (1990) encontraron en *L. corniculatus* que la habilidad de los cotiledones para expandirse y proveer superficie fotosintética está limitada por el número de células del embrión y su capacidad para aumentar el tamaño individual. La selección por estos componentes sería de gran potencial para mejorar la capacidad de expansión de los cotiledones. No obstante, estos autores sugieren la selección directa por la expansión del área como una alternativa simple y eficiente para mejorar el vigor de las plántulas de *L. corniculatus*. Esto podría ser también adecuado para *L. glaber*.

BIBLIOGRAFÍA

- Beuselinck P.R. & R.L. McGraw.** 1983. Seedling vigor of three *Lotus* species. *Crop Science* 23: 390-391.
- Black M. & J.E. Shuttleworth.** 1974. The role of the cotyledons in the photocontrol of hypocotyl extension in *Cucumis sativus* L. *Planta* 117: 57-66.
- Black M. & J.E. Shuttleworth.** 1976. Inter-organ effects in the photocontrol of growth. En: Smith H. (ed) *Light and plant development*. Butterworth, London, pp 317-331; (no visto). En: Gaba V. & M. Black. 1983. The control of cell growth by light. *Encyclopedia of Plant Physiology*, New Series 16 A, Eds. W. Shropshire, Jr. & H. Mohr. Springer-Verlag Berlin Heidelberg: pp 358-400,(371).
- Fonseca M.L., R.L. McGraw & P.R. Beuselinck.** 1990. Cotyledon cell number and size in birdsfoot trefoil. *Crop Science* 30: 266-270.
- Lovell P. & K.G. Moore.** 1970. A comparative study of cotyledons as assimilatory organs. *Journal of Experimental Botany* 21: 1017-1030.
- Mujica M.M. & C.P. Rumi.** 1991. Estado de dureza en las semillas de *Lotus tenuis*: efecto de las condiciones de conservación. *Revista 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 Facultad de Agronomía, La Plata* 69 1: 69-75.
- Opik H.** 1966. Changes in cell fine structure in the cotyledons of *Phaseolus vulgaris* L. during germination. *Journal Experimental Botany* 17: 427-439.
- Opik H. & E.W. Simon.** 1963. Water content and respiration rate of bean cotyledons. *Journal Experimental Botany* 14: 299-310.
- Qualls M. & C.S. Cooper.** 1968. Germination, growth and respiration rates of birdsfoot trefoil at three temperatures during the early non-photosynthetic stage of development. *Crop Science* 8: 758-760.
- Sevilla G.** 1989. Emergencia y establecimiento de *Lotus tenuis* en consociaciones con diferentes cultivares de *Festuca arundinacea* bajo regimenes de pastoreo por vacunos. M. Sc. Tesis. Facultad de Ciencias Agrarias, UN Mar del Plata, Balcarce, Argentina 158pp.
- Wulff R.D.** 1986. Seed size variation in *Desmodium paniculatum*. II Effects on seedling growth and physiological performance. *Journal of Ecology* 74: 99-114.