

EFFECTO DE LA TEMPERATURA SOBRE LA DISMINUCION DE LA DUREZA SEMINAL EN *STYLOSANTHES HAMATA* (LEGUMINOSAE)

TEMPERATURE EFFECTS ON HARDSEEDDEDNESS BREAKDOWN IN *STYLOSANTHES HAMATA* (LEGUMINOSAE)

Orlando Guenni^{1,4}, Don F. Cameron², Les. A. Edye³ y Calvin Rose⁴

¹ Dirección actual: Universidad Central de Venezuela, Facultad de Agronomía, Instituto y Departamento de Botánica Agrícola, Apartado 4579, El Limón, Maracay 2101, Venezuela.
Telefax: 58-43-464143. E-mail: guennio@agr.ucv.ve

² CSIRO, División de Pastos y Cultivos Tropicales, Brisbane, Australia.

³ CSIRO, División de Pastos y Cultivos Tropicales, Townsville, Australia.

⁴ Universidad de Griffith, Facultad de Ciencias Ambientales, Brisbane, Australia.

RESUMEN

En el presente trabajo se estudió el efecto de la temperatura sobre el grado de rompimiento de la dureza seminal en la leguminosa forrajera tropical, *Stylosanthes hamata*. Aún cuando el nivel inicial de semillas duras fue en general alto en todas las líneas estudiadas (63-93%), la exposición de la semilla en el laboratorio a temperaturas diarias constantes (63°C) y fluctuantes (25-63°C) por un período de más de tres meses, condujo a una reducción significativa del porcentaje de semillas duras (RSD). Estos resultados fueron corroborados en el campo al exponer la semilla a fluctuaciones naturales de temperatura (10-65°C) durante la época seca. Sin embargo, el grado de RSD varió marcadamente entre las líneas estudiadas (5-97%), dependiendo de la temperatura, el nivel de ploidía y de las características climáticas del sitio de origen. La mayor variabilidad que se observó en las líneas tetraploides pudiera asociarse a su patrón de crecimiento y a la mayor cantidad de hábitats ocupados. La correlación negativa encontrada en las líneas tetraploides entre la RSD y la duración del período de sequía del sitio de origen pudiera interpretarse como una estrategia adaptativa para que la germinación ocurra mayormente en el momento más favorable del año.

Palabras clave: Temperatura, *Stylosanthes*, semilla, latencia, dureza, disminución, ablandamiento, rompimiento.

ABSTRACT

In the present study, laboratory and field experiments were carried out to assess the effect of temperature and climate on harseeddedness breakdown of the tropical pasture legume *Stylosanthes hamata*. Though initial levels of hard seeds were generally high (63-93%) in all accessions studied, constant (63°C) and fluctuating temperatures (25-63°C) induced a significant decrease of hard seed content (DHS). These results were confirmed by those obtained under field conditions where seeds were exposed to bare soil surface temperatures of 10-65°C during the dry period. However, the degree of DHS varied (5-97%) according to temperature, genotype and place of collection. The observed higher variability in the DHS of tetraploid accessions may be associated with their growth pattern and higher numbers of habitats occupied by them along the species natural range of distribution. The negative correlation found in the tetraploid accessions between DHS and the dry period length of the collecting site, may be interpreted as an ecological strategy to match the main germination event with the more favorable time of the year for seedling survival.

Key words: Temperature, *Stylosanthes*, seed-coat, dormancy, hardseededness, breakdown, softening.

INTRODUCCION

Stylosanthes hamata (L.) Taub. es una leguminosa semi-arbustiva nativa del norte de Sur América e islas del Caribe (Williams *et al.* 1984, Edye 1988). La especie ha sido reconocida ampliamente por su potencial agronómico como

planta forrajera en los trópicos y sub-trópicos semi-áridos (Edye 1987).

La característica de dureza en la semilla es común dentro de la especie, al igual que otras del género *Stylosanthes* (McKeon y Mott 1984, Guenni *et al.* 1994). En *S. hamata* esta dureza está, al igual que en otras especies, asociada con una

EFFECTO DE LA TEMPERATURA SOBRE LA DUREZA SEMINAL EN *STYLOSANTHES HAMATA*

impermeabilidad al agua por parte de la cubierta seminal (Argel y Humphreys 1983, Castillo 1997). Por otra parte, el grado de expresión de este carácter parece estar controlado por la interacción entre el nivel de ploidía dentro de la especie y la temperatura ambiental alcanzada durante el desarrollo de la semilla en la planta madre (Guenni *et al.* 1994). Temperaturas por encima de 25°C durante el proceso de formación y maduración de la semilla, conducen en general a niveles de dureza seminal de más del 60% (Guenni *et al.* 1994). Por otro lado, la semilla que permanece recubierta por la vaina, tiende aún a conservar estos valores altos de dureza por un tiempo más prolongado (Hopkinson 1993).

La estabilidad en el nivel de dureza desarrollado parece depender también del porcentaje de humedad relativa alcanzado durante las últimas fases de maduración de la semilla en la

planta madre. Así, en general porcentajes de humedad por debajo de un 10% (sobre la base de peso seco) resultan en semillas con un alto grado de dureza difícil de romper (Quinlivan 1971).

De esta manera, el desarrollo de una cubierta seminal gruesa con una concentración alta de compuestos hidrofóbicos, así como la presencia de un micropilo e hilo totalmente sellados y asociados a un bajo contenido de humedad, garantizan la condición de dureza y la viabilidad de la semilla por un período largo de tiempo (Castillo 1997). Por consiguiente, el ablandamiento de la semilla dura bajo condiciones naturales debe representar, entonces, un mecanismo efectivo para la sincronización de la germinación con el período del año más favorable para la germinación. Por lo tanto, el estudio de los factores que controlan este proceso tiene una gran importancia tanto desde el

Tabla 1. Contenido de humedad (en base a peso seco) y grado de dureza inicial (como porcentaje del total de semillas viables) en la semilla de líneas de *Stylosanthes hamata* (Experimento 1).

Línea (CPI ¹ No.)	Nivel de ploidía ²	Grupo Geográfico ³	Porcentaje de humedad	Porcentaje de semillas duras
109308	D	B-PB	7,2 ⁴ (0,28) ⁵	71,5 ⁶ (1,01)
110119	D	B-PB	7,7 (0,28)	80,1 (1,11)
Verano	T	B-PB	7,3 (0,27)	88,4 (1,24)
Amiga	T	B-PB	7,3 (0,27)	91,5 (1,29)
110125	D	B-PM	6,9 (0,27)	89,3 (1,24)
110166	T	B-PM	6,9 (0,27)	93,9 (1,33)
110077	D	B-PA	6,4 (0,26)	88,1 (1,22)
110110	D	B-PA	7,4 (0,28)	90,7 (1,26)
110033	T	B-PA	9,1 (0,31)	76,5 (1,07)
110104	T	B-PA	6,7 (0,26)	91,6 (1,28)
109331	T	B-PA	7,5 (0,28)	87,0 (1,21)
110179	D	A-PB	7,0 (0,27)	89,1 (1,24)
110190	D	A-PB	6,4 (0,26)	87,8 (1,22)
110109	T	A-PB	9,2 (0,31)	92,5 (1,31)
110207	D	A-PM	6,3 (0,25)	72,8 (1,09)
110205	T	A-PM	7,2 (0,27)	92,8 (1,30)
110206	T	A-PM	6,5 (0,26)	87,0 (1,22)
110107	D	A-PA	6,6 (0,26)	86,5 (1,20)
Media ± STD			7,2 ± 0,8	85,5 ± 7,3
Rango			6,3 - 9,2	71,5 - 93,9
LSD (p<0,05) para los valores transformados			0,02	0,13

¹ CPI: Commonwealth Plant Introduction Number. ² **D**: Diploide, **T**: Tetraploide. ³ **B**: Altitud baja (<500 m), **A**: Altitud alta (> 500 m), **PB**: Precipitación baja (300-600 mm), **PM**: Precipitación media (700-900 mm), **PA**: Precipitación alta (>1000 mm). ⁴ Cada valor representa el promedio de 4 muestras de 0,25-0,50 g cada una. ⁵ Los valores en paréntesis son las transformaciones al arcoseno ($\sqrt{x+1}$). ⁶ Cada valor como el promedio de 3 muestras de 50 semillas cada una.

punto de vista ecológico como agronómico.

Los mecanismos responsables de la disminución en el porcentaje de semillas duras en poblaciones naturales, son variados. Entre ellos se incluyen la abrasión por el viento y agua, digestión por animales, fuego, temperaturas altas, cambios de temperatura y ataque por patógenos, entre otros (Rolston 1978, Werker 1980/1981). De estos mecanismos, las temperaturas altas o las fluctuaciones amplias de temperatura, que se presentan durante el día y a través del año en la superficie del suelo, son reconocidas como factores importantes que regulan el rompimiento del estado de dureza en la semilla de muchas especies (Quinlivan 1971, McKeon y Mott 1984, Baskin y Baskin 1989, Guenni 1992, Thanos *et al.* 1992, Vásquez y Orozco 1994).

El rompimiento natural de semillas duras en las leguminosas, parece estar regulado básicamente por dos factores: a) El grado de desecación de la semilla y b) las fluctuaciones de temperatura en la superficie del suelo. Para las semillas duras (con un contenido de humedad por debajo del crítico), la acción de la temperatura representa en muchos casos el único mecanismo efectivo para incrementar la germinación.

En climas tropicales y sub-tropicales, la acción de las altas temperaturas durante la época de sequía o durante los breves períodos de sequía que comúnmente se presentan en la época de lluvias, permite un incremento marcado en la germinación; a la vez que provee un medio efectivo para el rompimiento continuo y gradual de la dureza en la semilla y por consiguiente, el establecimiento de generaciones sucesivas de plántulas durante la estación o período de crecimiento (McKeon 1978, McKeon y Mott 1984). En el género *Stylosanthes*, el grado de reducción en el contenido de semillas duras varía entre y dentro de las especies, observándose en general un incremento marcado en la germinación a temperaturas del suelo por encima de 50-60°C (Gardener 1975, Mott *et al.* 1981, McKeon y Mott 1982). En *Stylosanthes sp.*, la temperatura máxima alcanzada y el tiempo de exposición a la misma constituyen los factores determinantes tanto en la rapidez como en el grado final de ablandamiento de semillas duras en el campo (McKeon 1978). Este patrón de respuesta a la temperatura ya había sido observado previamente en otras especies de leguminosas provenientes de climas mediterráneos (Quinlivan y Millington 1962, Quinlivan 1968, 1971, Hagon 1971).

Dado que en *S. hamata* el ablandamiento de semillas duras se había estudiado solo en el cv.

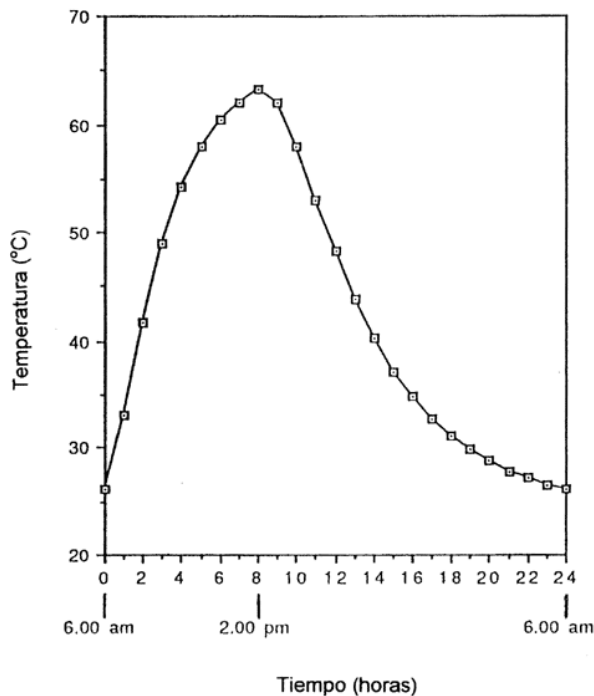


Figura 1. Patrón de fluctuación diaria de la temperatura (25-63°C) a la que fue expuesta la semilla de *Stylosanthes hamata* en condiciones de laboratorio (Experimento 1).

Verano (Argel y Humphreys 1983), los resultados obtenidos por Guenni *et al.* (1994) en varias líneas diploides y tetraploides sirvieron de base para el desarrollo del presente trabajo cuyos objetivos fueron: 1) Estudiar el patrón de variación dentro de la especie, en el rompimiento de la dureza seminal por el efecto de la temperatura, y 2) Establecer la relación entre el ablandamiento de semillas duras y el clima de origen de las distintas líneas de *S. hamata* seleccionadas.

MATERIALES Y MÉTODOS

Para los dos experimentos descritos a continuación, se utilizaron poblaciones de semillas provenientes de plantas cultivadas en un ambiente tropical (Estación Experimental Lansdown de la CSIRO, 19°40' S; 146°50' E) durante el período de crecimiento 1987-1988. Después de la cosecha, las semillas fueron almacenadas en cava (10°C, 25% humedad relativa) por 18-24 meses hasta ser utilizadas. En cada caso, se usaron solo las semillas con vainas correspondientes a la articulación superior de la vaina. Las líneas utilizadas en ambos experimentos (Tablas 1 y 3) corresponden a las 18 descritas por Guenni *et al.* (1994), en donde también

EFFECTO DE LA TEMPERATURA SOBRE LA DUREZA SEMINAL EN *STYLOSANTHES HAMATA*

Tabla 2. Porcentaje de semillas duras (RSD, en base al total inicial de semillas duras y viables) después de 120 días de exposición a 25°C (constante), 63°C (constante) y 25-63°C (fluctuante), en diferentes líneas de *Stylosanthes hamata* (Experimento 1).

Línea (CPI No.)	Nivel de ploidía	Grupo geográfico	Tratamiento de temperatura (°C)		
			25	63	25-63
109308	D	B-PB	12,2 (0,31) ¹	-6,1 (0,06)	4,5 (0,19)
110119	D	B-PB	-0,7 (0,12)	77,1 (1,08)	68,4 (0,98)
Verano	T	B-PB	-0,4 (0,17)	25,7 (0,53)	13,0 (0,34)
Amiga	T	B-PB	0,2 (0,12)	46,7 (0,75)	21,2 (0,47)
110125	D	B-PM	-3,5 (0,06)	18,2 (0,42)	28,0 (0,55)
110166	T	B-PM	3,7 (0,18)	16,8 (0,41)	21,1 (0,47)
110077	D	B-PA	6,3 (0,20)	80,9 (1,12)	74,4 (1,05)
110110	D	B-PA	5,0 (0,21)	57,0 (0,86)	30,5 (0,58)
110033	T	B-PA	16,0 (0,39)	84,9 (1,18)	47,1 (0,76)
110104	T	B-PA	2,3 (0,15)	65,7 (0,95)	33,5 (0,61)
109331	T	B-PA	0,4 (0,14)	69,0 (0,98)	42,4 (0,80)
110179	D	A-PB	2,7 (0,18)	91,2 (1,28)	75,0 (1,06)
110190	D	A-PB	-3,8 (0,06)	10,3 (0,32)	25,1 (0,52)
110109	T	A-PB	3,6 (0,14)	17,0 (0,42)	17,5 (0,43)
110207	D	A-PM	-0,6 (0,14)	25,5 (0,51)	12,2 (0,30)
110205	T	A-PM	3,4 (0,16)	23,4 (0,50)	13,9 (0,38)
110206	T	A-PM	-7,1 (0,02)	11,1 (0,31)	34,2 (0,62)
110107	D	A-PA	4,3 (0,20)	84,7 (1,17)	53,3 (0,82)
Media ± STD			2,4 ± 5,5	44,4 ± 31,9	34,2 ± 21,8
Rango			-7,1- 16,0	-6,1 - 91,2	4,5 - 75,0
LSD (p<0,05) para los valores transformados			0,31	0,19	0,24
De RSD					

¹ Valor de RSD con su respectiva transformación al arcoseno ($\sqrt{x+1}$), en paréntesis.

Cada valor como promedio de 3 repeticiones de 50 semillas cada una. En cada repetición, los valores negativos obtenidos de RSD se tomaron como RSD=0 para facilitar el análisis estadístico. Para las diferentes abreviaciones referirse a la Tabla 1.

se detalla la altitud y precipitación anual del sitio de procedencia de cada línea.

Experimento 1:
Efecto de temperaturas constantes y fluctuantes en el ablandamiento de semillas duras de líneas de *S. hamata*

Para este experimento, se aplicaron tres tratamientos de temperatura: a) 25°C constante (control), b) 63°C constante, y c) 25-63°C como fluctuación diaria de temperatura.

En las distintas líneas, las semillas se dividieron en tres lotes de acuerdo al número de tratamientos. En el tratamiento control (25°C, HR: 60-70%), las semillas se almacenaron en condiciones de laboratorio y la temperatura fue

mantenida constante con aire acondicionado. Para los otros dos tratamientos, dos estufas de laboratorio fueron programadas para dar los regimenes de temperatura requeridos. Para el tratamiento de temperatura fluctuante (25-63°C), se utilizó el diseño reportado por Quinlivan (1961, 1966), con el objeto de simular los cambios diarios en la temperatura de la superficie del suelo.

Las semillas de las diferentes líneas se colocaron en crisoles de porcelana, los cuales fueron a su vez introducidos en una caja de madera con tapa y aislada térmicamente con anime. Esto se hizo con la finalidad de exponer las semillas a una tasa diaria de calentamiento y enfriamiento relativamente lenta pero continua (Figura 1). La temperatura de la estufa se controló mediante un

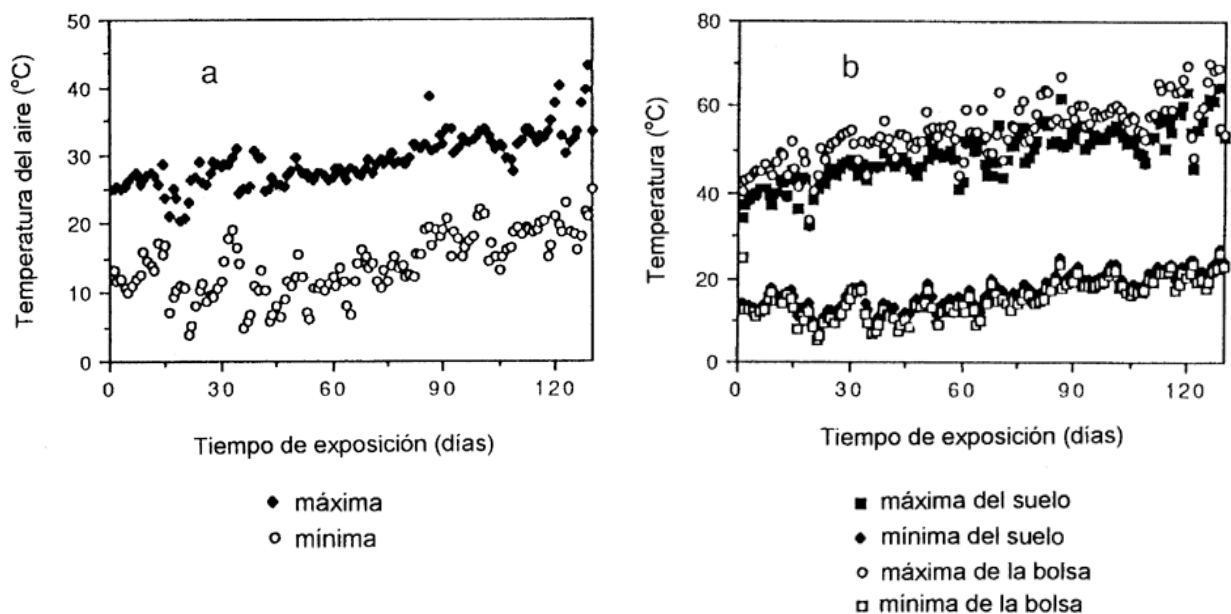


Figura 2. Temperatura del aire y de la superficie de un suelo desnudo en un sitio tropical (Lansdown, Australia) durante la época seca (Julio – Noviembre). Se señala también la temperatura registrada dentro de las bolsas de nylon donde se mantuvo a la semilla de *Stylosanthes hamata* (Experimento 2). **a:** Temperatura mínima y máxima del aire (°C), **b:** Temperatura mínima y máxima del suelo y dentro de las bolsas (°C).

interruptor de tiempo y la temperatura dentro de la caja fue registrada continuamente con un sensor introducido en la misma y conectado a un registrador de datos.

Cada 4 semanas, por un período de 120 días y se retiraban de la estufa sub-muestras (3 grupos de 50 semillas cada uno) de las distintas líneas para realizar la prueba de germinación respectiva, aplicando la metodología descrita por Guenni *et al.* (1994). En el tratamiento control, el porcentaje de semillas duras se determinó solo al comienzo y al final del experimento. El contenido de humedad inicial en la semilla se determinó de acuerdo al método recomendado por la International Seed Testing Association (ISTA 1966).

Los porcentajes de humedad inicial y de semilla dura obtenidos fueron transformados al arcoseno (Zar 1984) y las comparaciones entre medias (Tukey, $p < 0,05$) se llevaron a cabo al inicio y final del experimento de acuerdo a un factorial de 3

tratamientos de temperatura x 18 líneas x 6 grupos geográficos, en un diseño completamente aleatorizado. El efecto de la temperatura se midió a través de la reducción en el porcentaje de semillas duras (RSD), el cual se estimó de la siguiente manera:

$$RSD = (1 - (\% \text{ final de semillas duras} / \% \text{ inicial de semillas duras})) * 100$$

**Experimento 2:
Efecto de la temperatura del suelo en el ablandamiento de semillas duras de líneas de *S. hamata***

El experimento se llevó a cabo en Lansdown, Queensland (Australia) durante el período Julio-Septiembre 1990. Climáticamente, el sitio se caracteriza por poseer un promedio anual de precipitación de unos 800-900 mm. En general, las lluvias se concentran entre Noviembre y Abril,

EFFECTO DE LA TEMPERATURA SOBRE LA DUREZA SEMINAL EN *STYLOSANTHES HAMATA*

Tabla 3. Contenido inicial y final de semillas duras (porcentaje del total viable) bajo condiciones de laboratorio y el porcentaje de reducción correspondiente (RSD) en el campo, para diferentes líneas de *Stylosanthes hamata* (Experimento 2).

Línea (CPI No.)	Nivel de Ploidía	Grupo Geográfico	Contenido Inicial (laboratorio)	Contenido Final (laboratorio)	Promedio (laboratorio)	RSD (campo)
109308	D	B-PB	68,6	57,8	63,2 (0,92) ¹	60,8 (0,90)
110119	D	B-PB	56,6	62,0	59,3 (0,88)	88,9 (1,25)
110038	T	B-PB	87,5	90,8	89,2 (1,26)	32,4 (0,60)
Verano	T	B-PB	90,7	87,5	89,1 (1,24)	23,5 (0,50)
Amiga	T	B-PB	88,9	88,9	88,9 (1,26)	23,0 (0,50)
110077	D	B-PA	90,2	88,3	89,3 (1,27)	92,8 (1,30)
110033	T	B-PA	74,7	69,4	72,1 (1,02)	47,0 (0,76)
109331	T	B-PA	88,8	93,1	91,0 (1,28)	41,7 (0,70)
110179	D	A-PB	80,1	87,0	83,6 (1,17)	97,1 (1,45)
110190	D	A-PB	86,2	86,6	86,4 (1,20)	95,2 (1,36)
110109	T	A-PB	85,6	85,9	85,8 (1,19)	11,0 (0,32)
110107	D	A-PA	90,4	87,9	89,2 (1,26)	96,9 (1,42)
Media ± STD			82,4 ± 10,7	82,1 ± 11,9	82,3 ± 11,0	59,2 ± 33,4
Rango			56,6 - 90,7	57,8 - 93,1	59,3 - 91,0	11,0 - 97,1
LSD (p<0,05) para los valores transformados de RSD					0,17	0,15

¹ El valor dentro del paréntesis se refiere a la respectiva transformación del arcoseno ($v(x+1)$).

Cada valor como promedio de 4 repeticiones de 50 semillas cada una. Para las diferentes abreviaciones referirse a la Tabla 1.

aunque pueden ocurrir lluvias aisladas en los meses de sequía de Mayo-Octubre (Cook y Russell 1983). La temperatura máxima del suelo (a 5 cm de profundidad) puede variar entre 42° (Junio) y 60-65°C (Octubre-Noviembre), con una mínima que oscila entre 10° (Julio) y 25°C (Enero) (Mott *et al.* 1981).

En este caso se utilizaron solo 12 de las 18 líneas estudiadas en el experimento de laboratorio. Se incluyó sin embargo una línea adicional: CPI 110038, la cual pertenece al grupo climático B-PB (altitud: 10 m.s.n.m., precipitación anual: 564 mm). Para el desarrollo de este experimento, se utilizó un área de 4-5 m² desprovista de vegetación y tratada con herbicida e insecticida.

Por cada línea se utilizaron un total de 16 bolsas hechas de malla de nylon (huecos de 1 x 1,5 mm) de 15 (largo) x 15 (ancho) cm, conteniendo cada una un total de 200 articulaciones superiores con vaina. Una vez que se introdujeron las semillas, las bolsas fueron engrapadas y fijadas a la superficie del suelo mediante clavos. Un total de 192 bolsas conteniendo semilla de las distintas líneas fueron entonces distribuidas en cuatro bloques sobre la

superficie del suelo, donde cada bloque representaba cada uno de los meses respectivos de muestreo (Agosto-Noviembre 1990). Dentro de cada bloque se colocaron al azar cuatro repeticiones (bolsas) por línea. Los meses sucesivos de muestreo fueron distribuidos también al azar dentro del área experimental.

La información climática pertinente del lugar se obtuvo con los datos suministrados por una estación meteorológica ubicada al lado del área del experimento. La fluctuación diaria de temperatura tanto en la superficie del suelo desnudo como dentro de las bolsas se registró continuamente utilizando sensores de temperaturas conectados a un registrador de datos programado para tal fin.

Durante las fechas 4/8/90, 8/9/90, 12/10/90 y 16/9/90, se retiraron del suelo cuatro bolsas por línea. A continuación, sub-muestras de 50 semillas por bolsa se lavaron inmediatamente con fungicida a baja concentración para luego realizar las pruebas de germinación respectivas bajo las mismas condiciones del Experimento 1. Una muestra de semilla de todas las líneas se almacenó igualmente bajo condiciones de laboratorio (25°C, HR: 60-70%)

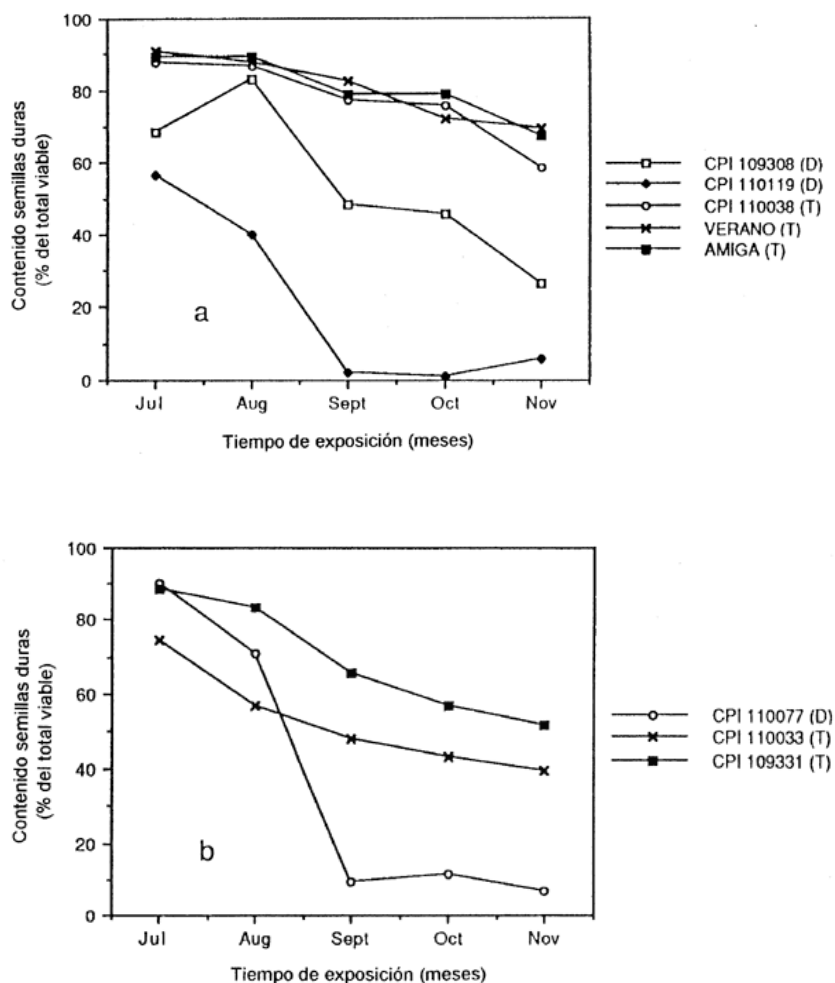


Figura 3. Patrón de disminución en el porcentaje de semillas duras en *Stylosanthes hamata* bajo condiciones de campo (Experimento 2). **a:** Grupo geográfico B-PB (altitud baja- precipitación baja), **b:** Grupo geográfico B-PA (altitud baja – precipitación alta).

para determinar el contenido de semillas duras al final del experimento.

Los valores iniciales y finales de semillas duras, así como la RSD (experimento 1) fueron comparados con un análisis de varianza, después de utilizarse la transformación del arcoseno (Zar 1984) y haciéndose la comparación múltiple mediante la prueba de Tukey ($p < 0.05$). Para comparar las distintas tasas de ablandamiento en la semilla dura bajo condiciones de campo, se utilizó un análisis lineal de covarianza (Zar 1984). En este caso, se utilizaron los coeficientes de regresión lineal respectivos, los cuales se obtuvieron a partir del análisis de regresión entre el logaritmo del porcentaje de semillas duras remanente y el tiempo de

exposición a las temperaturas fluctuantes del suelo.

En ambos experimentos, todos los análisis estadísticos se llevaron a cabo utilizando el paquete estadístico SAS/STAT (SAS Inst. Inc. 1987).

RESULTADOS

Experimento 1

La fluctuación diaria de temperatura obtenida en el laboratorio (Figura 1), con una mínima de 23° C y una máxima de alrededor de 63-65° C, simuló bastante bien los cambios diarios de temperatura en la superficie de un suelo desnudo en el trópico durante la época de sequía (McKeon 1978, Hacker y Ractcliff 1989, Casanova 1994.)

EFFECTO DE LA TEMPERATURA SOBRE LA DUREZA SEMINAL EN *STYLOSANTHES HAMATA*

Tabla 4. Tasas medias de reducción del contenido de semillas duras (TRSD, ln (porcentaje de semillas duras). mes⁻¹) en líneas de *Stylosanthes hamata* (Experimento 2).

Línea (CPI No.)	Grupo geográfico	TRSD (-)	r ²	a
109308 (D)	B-PB	0,251	0,769	***
110119 (D)	B-PB	0,724	0,691	***
110038 (T)	B-PB	0,096	0,617	***
Verano (T)	B-PB	0,075	0,584	***
Amiga (T)	B-PB	0,070	0,531	**
110077 (D)	B-PA	0,743	0,770	***
110033 (T)	B-PA	0,159	0,706	***
109331 (T)	B-PA	0,147	0,886	***
110179 (D)	A-PB	0,829	0,761	***
110190 (D)	A-PB	0,903	0,842	***
110109 (T)	A-PB	0,029	0,190	NS
110107 (D)	A-PA	0,932	0,870	***

***: p<0,0001, **: p<0,001, NS: No significativa. Para las diferentes abreviaciones referirse a la Tabla 1.

En la Tabla 1 se señala el contenido inicial de humedad (como porcentaje del peso seco) en la semilla de las distintas líneas utilizadas. Aunque la humedad de la semilla varió significativamente entre líneas (p<0,0001), la amplitud de esta variación (6,3 - 9,2 %) fue pequeña, estando los valores por debajo de un 10% (7,2 ± 0,8) en todos los casos.

El porcentaje inicial de dureza en la semilla fue en general alto (Tabla 1), aunque de nuevo varió significativamente (p<0,0001) entre las líneas, oscilando entre 72 (CPI 109308) y 94% (CPI 110166).

El porcentaje de dureza bajo condiciones de laboratorio (25°C) después de 120 días de almacenamiento, se muestra en la Tabla 2. Aunque en la mayoría de las líneas se observó solo una leve reducción en el contenido de semillas duras (0,2-6%), en las líneas CPI 109308 y 110033 se observó una reducción significativa (12 y 16 % respectivamente), mientras que en otros casos se encontró hasta un incremento del 7% (CPI 110206) en el grado de dureza seminal. En contraste, para los dos tratamientos de temperatura utilizados (Tabla 2) se encontró que, a excepción de la línea CPI 109308, en la cual no se produjo ninguna variación importante en el grado de dureza seminal, ambos regímenes de temperatura redujeron significativamente (p<0,0001) el nivel de semillas duras en todas las líneas. Sin embargo, el grado de reducción dependió tanto de la línea como del grupo geográfico en cuestión (p<0,0001). Las diferencias encontradas

entre líneas fueron a su vez dependientes de la interacción línea x régimen de temperatura (p<0,0001). No se encontró ningún efecto del nivel de ploidía sobre la RSD.

Aunque no se obtuvieron diferencias significativas entre ambos tratamientos de temperatura, el régimen de 63°C (constante) condujo a una relativa mayor reducción en el porcentaje de semillas duras en casi todas las líneas estudiadas (Tabla 2). Un patrón común para ambos tratamientos de temperatura fue la marcada reducción en el porcentaje de dureza en la semilla para algunas líneas al cabo de solo 30 días de exposición (Guenni 1992). Este fue el caso de las líneas CPI 110179 y 110077 en las que tal reducción representó alrededor del 70% del total encontrado al cabo de 4 meses de tratamiento a dichas temperaturas.

Con la excepción de CPI 110119 y 110179, la mayoría de las líneas provenientes de zonas con poca (300-600 mm) y mediana precipitación (700-900 mm) (grupos B-PB, A-PB, B-PM y A-PM), mostraron una reducción relativamente baja (14-34%) en el contenido de semillas duras a 25-63°C. En el caso de la línea CPI 109308 (grupo B-PB), la reducción fue casi insignificante, aún después de 120 días de exposición a altas temperaturas (Tabla 2). La mayor disminución en el grado de dureza seminal se observó en la línea CPI 110179 (grupo A-PB, Tabla 2), para la cual se obtuvo, después de tan solo 30 días de exposición, una reducción del 64 y 82% de semillas duras para las temperaturas de

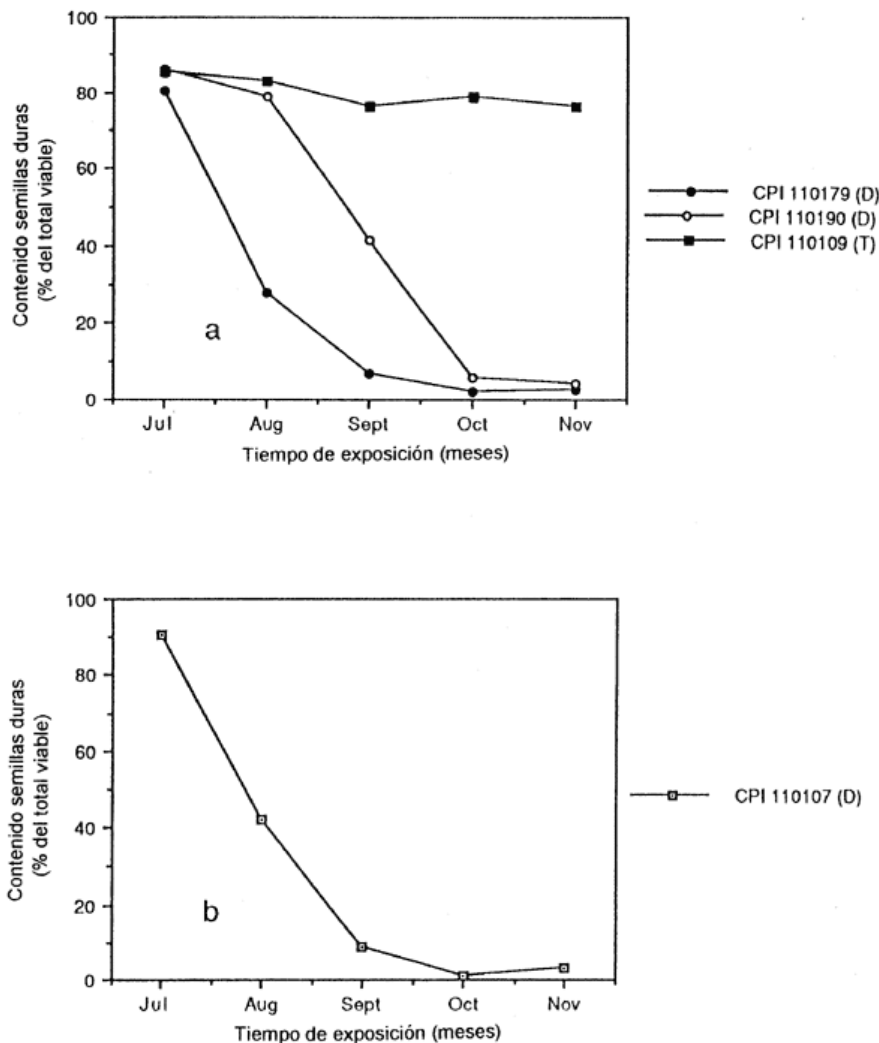


Figura 4. Patrón de disminución en el porcentaje de semillas duras en *Stylosanthes hamata* bajo condiciones de campo (Experimento 2). **a:** Grupo geográfico A-PB (altitud alta - precipitación baja), **b:** Grupo geográfico A-PA (altitud alta - precipitación alta).

25-63° y 63°C respectivamente (Guenni 1992).

Bajo el tratamiento 25-63°, las líneas CPI 110179, 110119 y todas las provenientes de climas con una alta precipitación anual (>1000 mm; grupos B-PA) mostraron en comparación con el resto de las líneas, la mayor reducción ($53 \pm 18\%$ vs. $19 \pm 9\%$) en el contenido de semillas duras al cabo de 120 días. Esta reducción fue aún más marcada a 63°C, variando la misma entre 57 (CPI 110110) y 91% (CPI 110179) para las dos líneas y grupos geográficos mencionadas anteriormente (Tabla 2).

Experimento 2

La Figura 2 muestra los cambios en la temperatura ambiental, la temperatura del suelo desnudo y la temperatura dentro de las bolsas que contenían las semillas, durante el experimento de campo. La temperatura mínima del aire varió entre 4°C (21/07/90) y 25°C (20/11/90). Solamente cuatro eventos aislados de lluvia ocurrieron durante el transcurso del experimento, en el lapso comprendido entre el 23/09/90 y el 21/10/90; dichas lluvias variaron entre 0,3 y 13 mm, con una cantidad total durante dicho período de 18,9 mm. La temperatura

mínima del suelo varió entre 9°C (22/08/90) y 27°C (19/11/90), mientras que la máxima osciló entre 33°C (01/08/90) y 65°C (18/11/90). La temperatura dentro de las bolsas siguió el mismo patrón de variación que la del suelo desnudo, siendo ligeramente mayor y menor respectivamente con respecto a la máxima y mínima registrada en la superficie del suelo (Figura 2b). En general, las semillas estuvieron expuestas a temperaturas máximas alrededor o por encima de 50°C desde el inicio del experimento (27/07/90, Figura 2b).

Los niveles iniciales de dureza en la semilla (Tabla 3) fueron comparables a los encontrados en el experimento de laboratorio (Tabla 1). Las diferencias encontradas entre las líneas ($p < 0.001$) fueron de nuevo asociadas a un menor contenido de semillas duras en CPI 110119 (57%), 109308 (69%) y 110033 (75%). En el resto de las líneas, el contenido inicial de semillas duras varió entre 80% (CPI 110179) y 91% (cv. Verano). Para las muestras expuestas a condiciones de laboratorio (25°C constante), la variación observada entre Julio y Noviembre (130 días) fue mínima y relativamente similar (1-7%) entre las líneas, incrementándose incluso en algunas de ellas el contenido inicial de semillas duras (Tabla 3). La única excepción fue la línea CPI 109308, en la cual este valor disminuyó en un 16% (Tabla 3).

Las Figuras 3 y 4 muestran el contenido de semillas duras bajo condiciones de campo durante el período de sequía. Al igual que en el experimento de laboratorio (Guenni 1992), el patrón de ablandamiento de las semillas varió dentro y entre grupos geográficos a lo largo del tiempo. Sin embargo, en general se observó una continua disminución en el número de semillas duras con el tiempo. A excepción de las líneas DPI 109308 y 110190 (Figuras 3a y 4a respectivamente), en la mayoría de las líneas el contenido de semillas duras no varió grandemente después de 60 días de exposición a la temperatura del suelo.

Las diferencias marcadas entre líneas en la tasa de ablandamiento de las semillas a través del tiempo (Tabla 4), condujeron entonces a diferencias altamente significativas ($p < 0.0001$) en el contenido residual de semillas duras en cada mes de muestreo (Guenni 1992).

Al cabo de las primeras cuatro semanas de exposición, la temperatura máxima dentro de las bolsas de nylon alcanzó los 50°C (Figura 2b). Para ese momento, se obtuvieron disminuciones marcadas en el porcentaje de semillas duras en algunas líneas. La mayor reducción fue de 68 y 53%

para las líneas CPI 110179 (Figura 4a) y CPI 110107 (Figura 4b) respectivamente, mientras que el cv. Amiga no mostró ninguna reducción (Figura 3a). Al final del experimento, la reducción acumulada en el contenido de semillas duras varió entre 11 (CPI 110109) y más del 95% (CPI 110119, 110190, 110109 y 110107), con diferencias altamente significativas ($p < 0.0001$) entre líneas (Tabla 3). En condiciones de campo, las líneas diploides CPI 109308 y 110190 mostraron una mayor reducción (61 y 93% respectivamente) en el contenido de semillas duras que bajo condiciones de laboratorio (5 y 25% respectivamente).

Aunque las diferencias entre grupos geográficos dependieron de las líneas ($p < 0.001$), los grupos B-PB (Figura 3a) y A-PB (Figura 4b) mostraron las reducciones más altas y bajas respectivamente en el contenido de semillas duras.

Igualmente, bajo condiciones de campo se observó también una clara diferenciación en el grado de reducción de la dureza seminal entre las líneas diploides y tetraploides. Las líneas diploides tuvieron, en general, valores casi ocho veces más altos que las tetraploides (Tabla 4), lo cual condujo a valores más altos de ablandamiento en las primeras para el final del experimento (Figuras 3 y 4)). En las líneas diploides se obtuvo una reducción final entre 61-97%, la cual fue significativamente mayor ($p < 0.05$) que la encontrada en las tetraploides (11-42%). Estas tasas altas de ablandamiento no estuvieron asociadas a ningún grupo geográfico en particular.

Al igual que lo encontrado en las diploides, las líneas tetraploides mostraron también diferencias significativas ($p < 0.001$) entre ellas, encontrándose que las líneas CPI 110331 y 109331 (grupo B-PA) tuvieron las mayores tasas de disminución en el contenido de semillas duras (Tabla 3).

Por otro lado, el grado de ablandamiento de semillas duras en casi todas las líneas, fue mucho mayor en el experimento de campo que en el de laboratorio. Por ejemplo, en las líneas CPI 109308 y 110190 el nivel de reducción fue de 5 y 25% respectivamente a 25°-63°C (Tabla 2), mientras que en condiciones de campo tenían, solo al cabo de 60 días de exposición, un 29 y 51% respectivamente de reducción (Figuras 3a y 4a). Para esa fecha, las temperaturas máximas diarias dentro de las bolsas de nylon estaban ya por encima de 55°C (Figura 2a).

La línea DPI 110109 fue la única en la que no se observó una reducción marcada en el contenido de semillas duras tanto en condiciones de campo (11%) como de laboratorio (17-18%). Su alto nivel

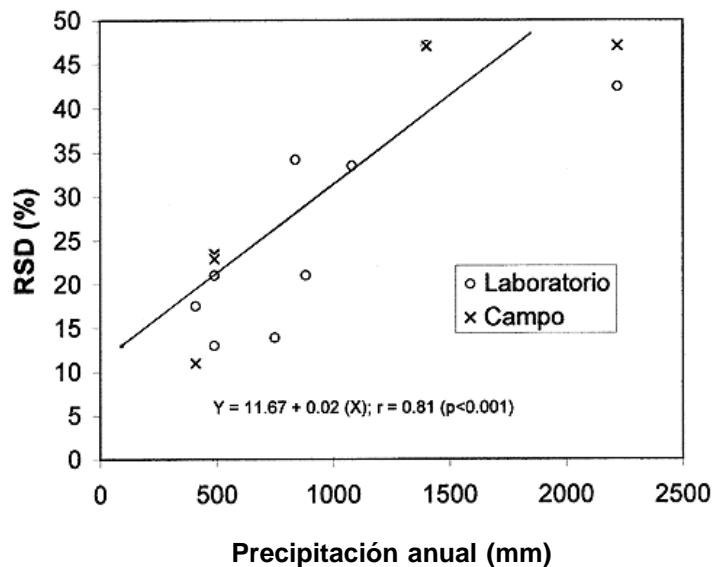


Figura 5. Correlación entre el grado de reducción total de semillas duras y la precipitación anual del sitio de origen en líneas tetraploides de *Stylosanthes hamata*.

de dureza seminal se mantuvo aún exponiendo la semilla a temperaturas continuas por encima de 60°C durante periodos más prolongados que en el campo.

DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos en este estudio evidencian, una vez más, el papel fundamental que ejercen las fluctuaciones naturales de la temperatura del suelo durante el período seco, sobre el ablandamiento de semillas duras en *S. hamata*. Este control ambiental se constituye entonces en el factor clave para incrementar la germinación durante el subsiguiente período lluvioso.

La alta dureza inicial en todas las líneas estudiadas estuvo asociada con un porcentaje de humedad menor que el valor crítico considerado como necesario para inducir una marcada impermeabilidad en la semilla (Quinlivan 1971). Por otro lado, en todas las líneas, aunque en grado variable, se encontró un incremento de la germinación debido al efecto de altas temperaturas. Estos resultados son comparables a los reportados por McKeon y Mott (1982, 1984) en algunas especies del género *Stylosanthes* y por Quinlivan (1961, 1966, 1968), Fairbrother y Pederson (1993) y Fairbrother (1997) en otras leguminosas de los

géneros *Lupinus* y *Trifolium*.

Los cultivares Verano y Amiga mostraron una tasa lenta de ablandamiento, con una disminución máxima del contenido de semillas duras entre 13 y 24% bajo la influencia de temperaturas fluctuantes tanto en el laboratorio como en el campo. Estos resultados son comparables a los obtenidos por McKeon (1978) en el cv. Verano (8-20%). Igualmente, en el mismo suelo donde se realizó el experimento de campo, Mott *et al.* (1981) encontraron un ablandamiento marcado en la dureza seminal de diferentes especies de *Stylosanthes* solo a partir del momento en que la temperatura máxima del suelo excedía 60°C (Octubre en adelante). Temperaturas del suelo por encima de 50°C incrementan sustancialmente la germinación en el banco de semillas de especies de *Stylosanthes* (Mott *et al.* 1981, McKeon y Mott 1982).

En este experimento las semillas dentro de las bolsas de nylon se expusieron a temperaturas por encima de 50°C desde el mes de Agosto, lo cual podría explicar el hecho de que algunas líneas mostraran una fuerte y temprana reducción en el contenido de semillas duras. La reducción significativa de la dureza seminal por debajo de 50°C (Julio-Agosto), observada en líneas como CPI 110179 y 110107, pudiera sugerir temperaturas críticas para el ablandamiento por debajo de las

reportadas por Mott *et al.* (1981). Esta diferencia entre especies con relación a la temperatura mínima requerida para un ablandamiento efectivo de la dureza seminal parece también ocurrir dentro del género *Trifolium* (Quinlivan 1966).

Los resultados de este estudio también indican posibles diferencias dentro de cada nivel de ploidía y entre grupos geográficos, las cuales estuvieron relacionadas al clima de origen. Cuando las líneas tetraploides son agrupadas de acuerdo al total de precipitación anual de la zona de procedencia, los resultados combinados de ambos experimentos bajo un régimen de temperatura fluctuante muestran una correlación positiva ($r = 0,81$, $p < 0,001$) entre el total de reducción en la dureza seminal (RSD) y la precipitación del lugar de origen (Figura 5).

En las regiones donde ocurren altas precipitaciones, en general se observa un período relativamente corto de sequía (2 a 4 meses, Guenni 1992), de manera que la disminución rápida observada en la dureza seminal para las líneas tetraploides, procedentes de estas zonas, pudiera representar una ventaja desde el punto de vista ecológico. En contraste, las líneas tetraploides procedentes de zonas con bajas precipitaciones, en la mayoría de los casos conservaron un nivel alto de dureza seminal, el cual solo disminuyó al final del período de sequía. En estas regiones usualmente se observan periodos de sequía de alrededor de 5 meses o más (Guenni 1992), por lo que el conservar un nivel alto de dureza seminal el cual no es disminuido sino después de una exposición prolongada a temperaturas altas del suelo, pudiera tener un valor adaptativo muy importante. Este mismo mecanismo biológico de adaptación que por un lado mantiene una fracción importante de semillas en el banco de semillas del suelo y por el otro, permite incrementar la germinación durante el periodo de lluvias, ha sido propuesto para otras especies de pastos tropicales (Hacker 1984, Hacker y Ratcliff 1989).

Las líneas diploides mostraron en general una reducción marcada en la dureza seminal por efecto de la temperatura, especialmente bajo condiciones de campo. Estas diferencias entre los dos niveles de ploidía pudieran, en parte, explicarse en términos del biotipo y del rango de distribución geográfica de los mismos. Las líneas diploides se comportan como bianuales a perennes (L.A. Edye, comunicación personal), en contraste con las tetraploides las cuales se comportan como anuales y por consiguiente requerirían de un mecanismo más efectivo de control de la latencia seminal. Igualmente, las líneas

tetraploides cubren un rango de distribución geográfica más amplio que las diploides (Guenni 1992), el cual incluye zonas con una gama más variada de regímenes de lluvia, por lo que esta estrategia de acoplar el nivel y la tasa de rompimiento de la dureza seminal a la longitud del periodo de sequía pareciera ser más importante en estas poblaciones. Las líneas diploides CPI 110190 y 110179 provienen de zonas de baja precipitación pero con un patrón bimodal de distribución de las lluvias en el año (Guenni 1992). En estos casos, el rápido rompimiento de la latencia, comparable al de las líneas provenientes de zonas de precipitación alta, pudiera interpretarse también como una adaptación a periodos relativamente cortos de sequía.

Las diferencias encontradas dentro de algunas líneas diploides con relación al grado de ablandamiento de la semilla dura, tanto en el laboratorio como en el campo, sugieren un rompimiento natural de la latencia seminal más dependiente de la fluctuación diaria de temperatura que de la máxima diaria. Esto contrasta con las observaciones hechas por Quinlivan (1966), Mott *et al.* (1981) y McKeon y Mott (1982) en otras leguminosas.

Finalmente, las diferencias marcadas en el grado de rompimiento de la dureza seminal pudieran estar asociadas a patrones contrastantes en la morfo-anatomía e histoquímica de la cubierta seminal, tal como lo han sugerido Hagon (1971), Tran y Cavanagh (1984) y Castillo (1997). Este tópico requiere por lo tanto más investigación.

El patrón de rompimiento de la dureza seminal en *S. hamata* es entonces una característica que varía grandemente dentro de la especie, siendo esta variación el resultado de un proceso adaptativo que se ha manifestado en distintas poblaciones de la misma como respuesta a condiciones particulares del hábitat.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo formó parte de la tesis doctoral del primer autor, la cual fue financiada por el Fondo Nacional de Investigaciones Agropecuarias (FONAIAP) y la Fundación Gran Mariscal de Ayacucho (Fundayacucho). Dedicado a la memoria de Les A. Edye, pionero en la colección y evaluación agronómica de germoplasma de *Stylosanthes hamata*. A los árbitros por sus valiosas observaciones y correcciones las cuales hicieron posible la publicación final de este trabajo.

LITERATURA CITADA

- ARGEL, P. J. y L. R. HUMPHREYS. 1983. Environmental effects on seed development and hardseededness in *Stylosanthes hamata* cv. Verano. I. Temperature. Australian Journal of Agricultural Research 34: 261-270.
- BASKIN, J.M. y C. C. BASKIN. 1989. Physiology of dormancy and germination in relation to seed bank ecology. Pp. 53-66, in Ecology of soil seed banks. M.A. Leck, V.T. Parker y R.L. Simpson (eds.): Ecology of soil seed banks. Part 2. Academic Press, San Diego, California.
- CASANOVA O., E. 1994. Introducción a la ciencia del suelo. 1ª edición. Consejo de Desarrollo Científico y Humanístico (CDCH), Universidad Central de Venezuela, Caracas.
- CASTILLO, R. 1997. Estudio de la dureza seminal en *Stylosanthes hamata* (L.) Taub y su relación con las características morfoanatómicas de la cubierta seminal. MSc. Tesis. Post-Grado de Botánica Agrícola. Facultad de Agronomía. Universidad Central de Venezuela. 126 p.
- COOK, S. J. y J. S. RUSSELL. 1983. The climate of seven CSIRO field stations in northern Australia. Division of Tropical Crops and Pastures. Technical Paper No. 25. CSIRO, Australia. 38 p.
- EDYE, L. A. 1987. Potential of *Stylosanthes* for improving tropical grasslands. Outlook on Agriculture, 16(3): 124-130.
- EDYE, L. A. 1988. *Stylosanthes* collecting in Colombia and Venezuela. 16/01/86 to 05/09/86. Final Report. CSIRO. Townsville, Australia.
- FAIRBROTHER, T. E. 1997. Softening and loss of subterranean clover hard seed under sod and bare ground environments. Crop Science 37: 839-844.
- FAIRBROTHER, T. E. y G. A. PEDERSON. 1993. A rapid technique for measuring the breakdown rate of hardseededness in subterranean clover. Crop Science 33:560-565.
- GARDENER, C. J. 1975. Mechanisms regulating germination in seeds of *Stylosanthes*. Australian Journal of Agricultural Research. 26: 281-294.
- GUENNI, O. 1992. Phenotypic variability in *Stylosanthes hamata* in relation to seed dormancy, growth and reproductive behaviour. PhD. Thesis. Faculty of Environmental Sciences. Griffith University. Brisbane, Australia. 432 p.
- GUENNI, O., D. F. CAMERON, L. A. EDYE y C. ROSE. 1994. Germinación y dureza seminal en *Stylosanthes hamata* (Leguminosae). Ecotropicos 7(1): 1-12.
- HACKER, J. B. 1984. Genetic variation in seed dormancy in *Digitaria milanjiana* in relation to rainfall at the collection site. Journal of Applied Ecology 21: 947-959.
- HACKER J. B. y D. RATCLIFF. 1989. Seed dormancy and factors controlling dormancy breakdown in Buffel grass accessions from contrasting provenances. Journal of Applied Ecology 26: 201-212.
- HAGON, M. W. 1971. The action of temperature fluctuations on hard seeds of subterranean clover. Australian Journal of Experimental Agriculture and Animal Husbandry 11: 440-443.
- HOPKINSON, J.M. 1993. Tropical pasture establishment. 2. Seed characteristics and field establishment. Tropical Grasslands 27(4): 276-290.
- International Seed Testing Association (ISTA). 1966. Determination of seed moisture content. Proceeding International Seed Testing Association 1: 129-134.
- MCKEON, G. M. 1978. Seed dynamics of some pasture species in a dry monsoonal climate. PhD. Thesis. Griffith University. Australia.
- MCKEON, G. M. y J. J. MOTT 1982. The effect of temperature on the field softening of hard seed of *Stylosanthes humilis* and *Stylosanthes hamata* in a dry monsoonal climate. Australian Journal Agricultural Research 33: 75-85.
- MCKEON, G. M. y J. J. MOTT, J. J. 1984. Seed Biology of *Stylosanthes*. Pp. 311-318, in H. M. Stace y L. A. Edye (eds): The Biology and Agronomy of *Stylosanthes*. Academic Press, Sydney.
- MOTT, J. J., G. M. MCKEON, C. J. GARDENER, y L. T. MANNETJE. 1981. Geographic variation in the reduction of hard seed content of *Stylosanthes* seeds in the tropics and subtropics of Northern Australia. Australian Journal of Agricultural Research 32: 861-869.
- QUINLIVAN, B. J. 1961. The effect of constant and fluctuating temperatures on the permeability of the hard seed of some legume species. Australian Journal of Agricultural Research 12: 1009-1022.
- QUINLIVAN, B. J. 1966. The relationship between temperature fluctuations and the softening of hard seeds of some legume species. Australian Journal of Agricultural Research 17: 625-631.
- QUINLIVAN, B. J. 1968. Seed coat impermeability in the common annual legume species of Western Australia. Australian Journal of Experimental Agriculture and Animal Husbandry 8: 695-701.
- QUINLIVAN, B. J. 1971. Seed coat impermeability in legumes. Journal of Australian Institute of Agricultural Sciences 37: 283-295.
- QUINLIVAN, B. J. y A. J. MILLINGTON. 1962. The effect of a mediterranean summer environment on the permeability of hard seeds of subterranean clover. Australian Journal of Agricultural Research 13: 377-387.
- ROLSTON, M. P. 1978. Water impermeable seed dormancy. Botanical Review 44: 365-396.
- SAS Institute Inc. 1987. SAS/STAT™ Guide for Personal Computers, Version 6 Edition. Cary, NC: SAS Institute Inc..1028 p.
- THANOS, C. A., K. GEORGHIOU, C. KADIS y C. PANTAZI. 1992. CISTACEAE: A family with hard

EFECTO DE LA TEMPERATURA SOBRE LA DUREZA SEMINAL EN *STYLOSANTHES HAMATA*

- seeds. Israel Journal of Botany 41: 251-263.
- TRAN, V. N. y A. K. CAVANAGH. 1984. Structural aspects of dormancy. Pp.1-44, in D.R. Murray (ed): Seed physiology. Vol. 2. Academic Press, Sydney.
- VÁZQUEZ Y., C. y A. OROZCO S. 1994. Signals for seeds to sense and respond to gaps. Pp. 209-236, in M.M. Caldwell y R.W. Pearcy (eds): Exploitation of environmental heterogeneity by plants. Academic Press, Inc., San Diego.
- WERKER, E. 1980/1981. Seed dormancy as explained by the anatomy of embryo envelopes. Review. Israel. Journal of Botany 29: 22-44.
- WILLIAMS, R. J., R. REID, R. SCHULTZE-KRAFT, N. M. SOUSA COSTA, y B. D. THOMAS 1984. Natural distribution of *Stylosanthes*. Pp. 73-102, in H. M. Stace y L. A. Edye (eds): Biology and agronomy of *Stylosanthes*. Academic Press, Sydney.
- ZAR, J. H. 1984. Biostatistical analysis. 2ª edición. Prentice-Hall International, Inc., New Jersey.

Recibido 23 agosto 1999; revisado 08 marzo 2000;
aceptado 26 mayo 2000.