

Caracterización morfológica de semillas y plántulas de *Lotus tenuis* y *Lotus corniculatus* para diferenciar las especies en muestras de semillas

Murcia, Mónica Liliana^{1,2}; Anna Peretti¹; Silvina San Martino¹

¹Facultad de Ciencias Agrarias. Universidad Nacional de Mar del Plata. Ruta Nacional 226Km 73,5. Balcarce (7620) Provincia de Buenos Aires. Argentina; ²mmurcia@mdp.edu.ar

Murcia, Mónica Liliana; Anna Peretti; Silvina San Martino (2015) Caracterización morfológica de semillas y plántulas de *Lotus tenuis* y *Lotus corniculatus* para diferenciar las especies en muestras de semillas. Rev. Fac. Agron. Vol 114 (1): 38-43

El objetivo fue caracterizar morfológicamente las semillas y las plántulas en fase temprana de *Lotus tenuis* (Lt) y *Lotus corniculatus* (Lc) para diferenciar ambas especies a partir de muestras de semillas. Se estudiaron veintiocho muestras observándose en semillas la morfología de la región hilar, y en plántulas la pubescencia del epicótilo y del folíolo central del profilo, la forma de las células epidérmicas y las longitudes de las células oclusivas y epidérmicas en folíolos y cotiledones. El recuento cromosómico en células meristemáticas de radículas permitió verificar especies, $2n=2x=12$ en Lt y $2n=4x=24$ en Lc. Los datos se analizaron mediante pruebas de homogeneidad de proporciones y comparación de promedios. La región hilar de las semillas presentó tres formas con frecuencias variables, por lo que no fue válido para diferenciar especies. La pubescencia del epicótilo y folíolo central del profilo fue nula o muy escasa en Lt y claramente presente en Lc, resultando un carácter válido para diferenciar las dos especies. La forma de las células epidérmicas de folíolos y cotiledones no fue útil para la diferenciación. El tamaño de las células epidérmicas en la superficie superior y en la inferior y el tamaño de las células oclusivas en la epidermis superior del cotiledón tampoco tuvieron valor diagnóstico. En consecuencia los caracteres útiles para diferenciar y establecer proporciones de las dos especies a partir de muestras de semillas fueron el recuento cromosómico y la pubescencia en el epicótilo y del folíolo central del profilo.

Palabras clave: semillas, plántulas, identificación, morfología

Murcia, Mónica Liliana; Anna Peretti; Silvina San Martino (2015) Morphological characterization of seeds and seedlings of *Lotus tenuis* and *Lotus corniculatus* in order to differentiate species in seed samples. Rev. Fac. Agron. Vol 114 (1): 38-43

The aim was to morphologically characterize the seeds and the seedlings of *Lotus tenuis* and *Lotus corniculatus* in order to differentiate samples of seeds of both species. Twenty eight samples were studied to observe: in seeds, the morphology of the hilar region; in seedlings, the central leaflet pubescence of the first leaf and the epicotyl pubescence, the morphology of the epidermal cells, and the length of the occlusive and epidermal cells in leaflets and cotyledons. The chromosome counting in root meristematic cells allowed to verify species, $2n=2x=12$ in Lt and $2n=4x=24$ in Lc. Data were analyzed by homogeneity of proportions and compare means. The hilar region of the seeds presented three shapes with variable frequencies, therefore it was not valid to differentiate species. The pubescence was null or very scarce in Lt and clearly visible in Lc, being this a valid feature to differentiate the species. The shape of the inferior epidermis cells in leaflets and cotyledons was not useful to differentiate the species. The size of the epidermal cells on the upper and the lower surface and the size of guard cells in the upper epidermis of cotyledon did not provide diagnostic value to differentiate both species. Therefore, the useful characteristics to differentiate and establish proportions between the two species on samples of seeds, were the chromosome count and the pubescence of epicotyl and central leaflet of the first leaf.

Keywords: seeds, seedlings, identification, morphology

Recibido: 21/03/2014

Aceptado: 25/03/2015

Disponible on line: 15/06/2015

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

INTRODUCCION

Lotus tenuis Mill. (Lt) y *Lotus corniculatus* L. (Lc) son dos especies leguminosas perennes (Fabaceae) que crecen en amplias zonas de la provincia de Buenos Aires (Burkart, 1952). Presentan similar valor forrajero pero diferentes requerimientos edáficos y culturales (Vignolio, et al., 1996). *Lotus tenuis* es una especie originaria de Europa meridional y Asia, y *L. corniculatus* es originaria de la cuenca del Mediterráneo y norte de África (Maddaloni & Ferrari, 2005)

Según Dawson (1941) *L. corniculatus* sería un autotetraploide ($2n=2x=24$) de *L. tenuis* ($2n=2x=12$). La constancia del número cromosómico en ambas especies ha sido comprobada por varios investigadores (Peretti, et al., 1994; Celotto & Sanso, 2008) y se toma como referencia para la identificación.

Lotus corniculatus se desarrolla en suelos fértiles, ligeramente ácidos, mientras que *L. tenuis* se desarrolla en cambio en suelos salobres, de escasa fertilidad. *Lotus tenuis* se ha naturalizado en la Pampa Deprimida, presenta la capacidad de adaptarse a condiciones de sequía así como a campos bajos anegadizos (Montes, 1992; Vignolio, et al., 1996; Maddaloni & Ferrari, 2005). Para la implantación de los cultivos es imprescindible la identificación correcta de las semillas de cada especie. Pero la gran similitud en la morfología y en el tamaño de las semillas hace prácticamente imposible diferenciar las dos especies por la simple observación de las características externas de las semillas o por diferencias de peso, particularmente cuando se trata de mezclas.

Varios autores han tratado de establecer diferencias morfológicas y anatómicas de las semillas y de las plántulas de ambas especies, a fin de utilizar dichos caracteres en la diferenciación de las especies en mezclas de semillas.

Arambarri & Colares (1993) determinaron el tamaño y el peso de las semillas de las dos especies y concluyeron que si bien los valores promedio de tamaño y peso de las semillas de *Lotus corniculatus* son mayores que los de *Lotus tenuis*, la amplia variación existente en los valores extremos no permite distinguir las dos especies en una mezcla de semillas. Las características relativas a la forma de las semillas y a su anatomía tampoco permitieron distinguirlos.

Dizeo de Strittmatter et al. (1985) estudiaron, por medio de microscopía de barrido, la morfología de la región hilar, determinando la relación entre el ancho del arilo en la parte media del hilo y el ancho del mismo en la región micropilar. Estos autores encontraron diferencias en dicha relación para las dos especies, indicando que presentaban diferentes formas en la región hilar: Lt presentó forma de "tulipán", en cambio Lc presentó forma de "herradura".

Milano (1977) describió las semillas y las plántulas de Lc y Lt. En las plántulas registró diferencias en cuanto a la pubescencia. En Lc el epicótilo y los folíolos de la primera hoja presentan pelos ralos blancos y adpresos, mientras que las plántulas de Lt son glabras. Sin embargo, Lagler (2003) indicó que dicha característica no permitía diferenciar las especies debido a la variabilidad del carácter dentro de cada especie.

En cuanto a la anatomía foliar en plantas adultas de ambas especies, se informó que el tamaño de estomas era diferente entre ambas (Arambarri & Colares, 1993): Lt presentaba células estomáticas más cortas que Lc, en correspondencia con un mayor número de los mismos por unidad de área. Las células epidérmicas mostraron paredes onduladas en diferentes grados en ambas especies. En referencia a la pubescencia, Lc presentó sólo unos pocos pelos simples largos y delgados en los folíolos así como otros más cortos en peciolos y peciolulos.

Kade et al. (1997) estudiaron muestras de semillas de Lt y Lc por medio de cromatografía de capa delgada (TLC) y verificaron la importancia de algunas sustancias contenidas en las mismas (flavonoles) como marcadores, que permitían una adecuada diferenciación entre semillas de las dos especies. Sin embargo, la técnica no permitió establecer proporciones de ambas especies en mezclas de semillas.

Pallares et al. (2000) concluyeron, a partir de sus resultados, que la técnica de electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico (SDS-PAGE) permitía identificar lotes de semillas de Lc y Lt, no sólo en muestras puras sino también en mezclas. Estudios más recientes con esta metodología fueron útiles para clasificar con precisión algunos de los genotipos comparados (Galussi et al., 2006). Dichos autores sugirieron aplicar más de un método de extracción por electroforesis y/o el estudio de distintas fracciones de proteínas o análisis de isoenzimas. Si bien estas técnicas tienen actualmente amplia difusión, no todos los laboratorios de análisis de semillas cuentan con el equipamiento adecuado ni con el personal entrenado para estas determinaciones.

El recuento de cromosomas mitóticos en células meristemáticas de radículas es un método confiable y rápido para identificar y diferenciar semillas de ambas especies de *Lotus* (Celotto & Sanso, 2008) que permite cuantificar las proporciones en mezclas de semillas. Esta técnica ha sido empleada asiduamente en el laboratorio de semillas de la EEA INTA Balcarce (Peretti et al., 1994), tanto para diagnóstico de muestras de productores como para la verificación de muestras empleadas en investigación (Pallares et al., 2000). Es un método altamente confiable siempre y cuando en los laboratorios se cuente con equipo y, especialmente, con el personal entrenado para efectuar los recuentos cromosómicos.

Dadas las dificultades en la identificación de las semillas de ambas especies, y en particular en la diferenciación en mezclas, resulta muy oportuno encontrar un método sencillo y de bajo costo para un diagnóstico rápido y seguro de las semillas en laboratorio. Atributos de las plántulas tales como la pubescencia en el folíolo central, el tamaño y la forma de las células epidérmicas y oclusivas de los cotiledones y del folíolo central del perfillo pueden ser válidos para establecer la proporción de las dos especies de *Lotus* en mezclas de semillas.

En función de ello, el objetivo del trabajo fue caracterizar morfológicamente las semillas y las plántulas en la fase temprana de desarrollo de *L. tenuis* y *L. corniculatus*, para verificar la presencia de atributos

que permitan diferenciar las dos especies a partir de muestras semillas.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se estudiaron las semillas y las plántulas de 16 muestras de *L. tenuis* y 12 muestras de *L. corniculatus*, pertenecientes a poblaciones naturalizadas de la provincia de Buenos Aires y a cultivares comerciales.

En la especie *L. tenuis* los cultivares fueron: TS Chajá, San Miguel del Monte, Toba, Población Pergamino, INTA 106, INTA 3151, mientras que las introducciones del Banco de Germoplasma de Forrajeras de la EEA INTA Balcarce correspondieron a los números de entrada 869429, 860453, 860439, 860435, 860434, 860428, 860430, 860449, 860444, 860446.

En la especie *L. corniculatus* los cultivares fueron: San Gabriel origen Brasil, San Gabriel origen Concepción del Uruguay, El Boyero, Norcen, Carrol, La Estanzuela, Georgia, Dawn, Fergus, Empire, El Boyero (INTA) y Quimey.

Los siguientes estudios fueron llevados a cabo en las instalaciones del Laboratorio de Análisis de Semillas de la Unidad Integrada Balcarce.

Observación de la morfología de la región hilar de las semillas.

Se procedió a la observación de la región hilar de 50 semillas por muestra. Para ello se utilizaron cajas de Petri de 9 cm de diámetro con una delgada capa de parafina solidificada en la cual se marcaron 25 hoyos. En cada se alojó una semilla con la región hilar expuesta para su observación bajo microscopio estereoscópico (60 X). También se realizaron observaciones de la región hilar por microscopio electrónico de barrido (MEB), previo metalizado de las muestras con oro-paladio (D'Ambroggio de Argüeso, 1986). Este proceso se llevó cabo en el Instituto de Investigaciones Científicas y Técnicas de las Fuerzas Armadas (C.I.T.E.F.A).

Registro de pubescencia en plántulas.

Se sembraron tres bandejas con 50 semillas de cada muestra en condiciones de germinación estándar según ISTA (2008), sobre papel de filtro húmedo; a 20°C de temperatura constante, con 8 horas de luz y 16 horas de oscuridad, durante 35 días. Se seleccionaron 100 plántulas normales por muestra y se efectuaron observaciones con microscopio estereoscópico (60 X) al estado de primera hoja desarrollada. Se efectuaron recuentos de tricomas (pubescencia) en la totalidad del epicótilo y del folíolo central del perfilo, entre los 12 y los 35 días de la siembra.

Estudio de epidermis en plántulas

En otras 10 plántulas por muestra obtenidas en las mismas condiciones se extrajeron porciones de epidermis (peeling) de los cotiledones y del folíolo central del perfilo. Los preparados de la epidermis abaxial (inferior) del folíolo central del perfilo y, de las epidermis abaxial y adaxial de los cotiledones se analizaron bajo microscopio óptico (500 X), efectuándose los recuentos en la superficie del campo

del microscopio en dicho aumento. Se registró la forma de las células epidérmicas y se midió la longitud de las células oclusivas y epidérmicas, efectuándose 60 mediciones/plántula.

Recuento de cromosomas en células meristemáticas de radículas

Para verificar la constitución genética de las muestras de las dos especies (Lc: $2n=4x=24$ cromosomas; Lt: $2n=2x=12$ cromosomas), (Celotto & Sanso, 2008), se sembró una cantidad de semillas suficiente como para obtener 20 plántulas por muestra, en condiciones de germinación estándar. Se recolectaron las radículas, de aproximadamente 2 mm de longitud, se trataron con 8- hidroxiquinoleina y se fijaron en Carnoy, según la técnica descrita por D'Ambroggio de Argüeso (1986). Luego se procedió a efectuar el recuento cromosómico de 5 placas metafásicas por ápice radicular, con la técnica de observación de cromosomas somáticos (D'Ambroggio de Argüeso, 1986).

Previo comprobación de homogeneidad de los recuentos en los cultivares dentro de especies, los datos se utilizaron para comparar las dos especies. Los datos correspondientes a recuentos se analizaron mediante pruebas de homogeneidad de proporciones, prueba de independencia y comparación de dos promedios utilizando el test de Fisher (Steel & Torrie, 1988). Los datos correspondientes a mediciones se analizaron por medio de análisis de varianza y los promedios se compararon con el test de mínimas diferencias significativas (MDS), con un nivel de significación del 5%.

RESULTADOS Y DISCUSION

La morfología de la región hilar (Figura 1) permitió identificar tres formas básicas: "redonda", "herradura" y "abanico". Dicha clasificación no coincidió con la propuesta por Dizeo de Strittmatter *et al.* (1985), quienes identificaron dos formas diferentes, correspondientes a cada especie. Las frecuencias de las tres diferentes formas de arilo (Tabla 1) reconocidas en este trabajo variaron independientemente de la especie según la prueba de Independencia. Por ello, este carácter no resultó válido para identificar las especies, a diferencia de lo consignado por los autores antes mencionados.

Tabla 1. Frecuencia (%) de los diferentes tipos morfológicos de la región hilar en 16 cultivares de *Lotus tenuis* y 12 cultivares de *L. corniculatus*. Promedio de 50 semillas/ cultivar.

Forma	<i>Lotus tenuis</i>	<i>Lotus corniculatus</i>
Redondo	43,55	33,85
Herradura	16,20	32,30
Abanico	40,25	33,85

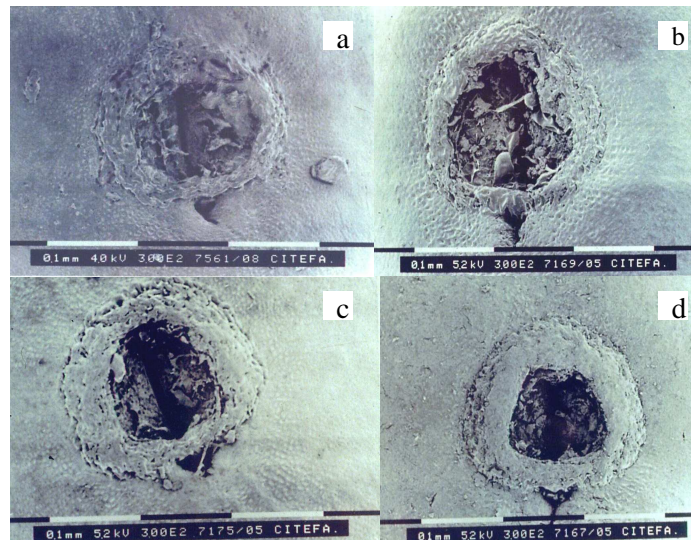


Figura 1- Vista con microscopio electrónico de barrido (MEB) de región hilar con forma redonda en semilla de *Lotus tenuis* (a); en semilla de *L. corniculatus* (b) y de región hilar en "herradura" en *L. Tenuis* (c) y *L. corniculatus* (d).

Las células de la epidermis inferior en folíolos y en cotiledones presentaron heterogeneidad de formas en ambas especies, predominando la forma isodiamétrica en folíolos y la alargada en cotiledones. Se registró una tendencia hacia contornos sinuosos en las células de los bordes y del ápice de ambos órganos. En la epidermis superior de los cotiledones se observaron células poligonales anchas, con paredes onduladas o angulosas en algunos cultivares, en coincidencia con Arambarri & Colares (1993) quienes observaron que las células epidérmicas de los folíolos en plantas desarrolladas mostraban paredes onduladas en diferentes grados en ambas especies. De acuerdo al test de homogeneidad de proporciones no hubo evidencias de que las formas ondulada y poligonal de las células epidérmicas de los órganos considerados permitan diferenciar a las especies en las plántulas evaluadas en los primeros estados (Datos no presentados).

En la figura 2 se observan porciones de la epidermis superior de los cotiledones de ambas especies. Si bien los valores promedio, tanto de la longitud de las células epidérmicas como oclusivas, presentaron diferencias significativas ($p \leq 0,05$) entre las especies en estudio (Tabla 2), la variación existente entre los valores individuales en las muestras evaluadas de las dos especies, impiden que dicha medida sea utilizada como atributo para diferenciar especies. Para el resto de las variables cuantitativas consideradas no hubo evidencias que indicaran heterogeneidad de varianzas entre las especies. Por lo tanto, los tamaños de las células epidérmicas y oclusivas de la epidermis inferior de los folíolos, así como de las células oclusivas de la epidermis inferior de los cotiledones no tuvieron valor diagnóstico para diferenciar las dos especies en los primeros estados de plántula, y estimar la proporción de

las mismas en lotes de semillas. Contrariamente, Arambarri & Colares (1993), trabajaron con plantas en un estado más avanzado y detectaron diferencias en el tamaño de los estomas de epidermis foliar entre las dos especies: Lt presentaba células estomáticas más cortas que Lc, en correspondencia con un mayor número de los mismos por unidad de área.

Tabla 2. Tamaño promedio y desvío estándar (μm) de células epidérmicas y oclusivas de la epidermis inferior y superior de cotiledones de 16 cultivares de *Lotus tenuis* y 12 de *L. corniculatus*. * Diferencias significativas entre columnas para cada fila ($p \leq 0,05$).

Epidermis del cotiledón	Célula	<i>Lotus tenuis</i> (μm)	<i>Lotus corniculatus</i> (μm)
Inferior	Epidérmica	40,8 \pm 21*	46,2 \pm 24 *
Superior	Epidérmica	56,3 \pm 27 *	65,7 \pm 32 *
	Oclusiva	29,2 \pm 7 *	34 \pm 19 *

Respecto a las observaciones de pubescencia, se encontró que las plántulas de *L. tenuis* de todas las muestras estudiadas fueron glabras (Figura 3, a) o con tricomas muy escasos (4-5), mientras que las plántulas de *L. corniculatus* presentaron pubescencia en el epicótilo y en el folíolo central del perfilo (Figura 3, b) en coincidencia con lo hallado por Lagler (2003) y Milano (1977). La prueba de independencia demostró la alta proporción de plántulas pubescentes en *L. corniculatus* y la elevada proporción de plántulas glabras en *L. tenuis* (Tabla 3). Dicho análisis estadístico permitió

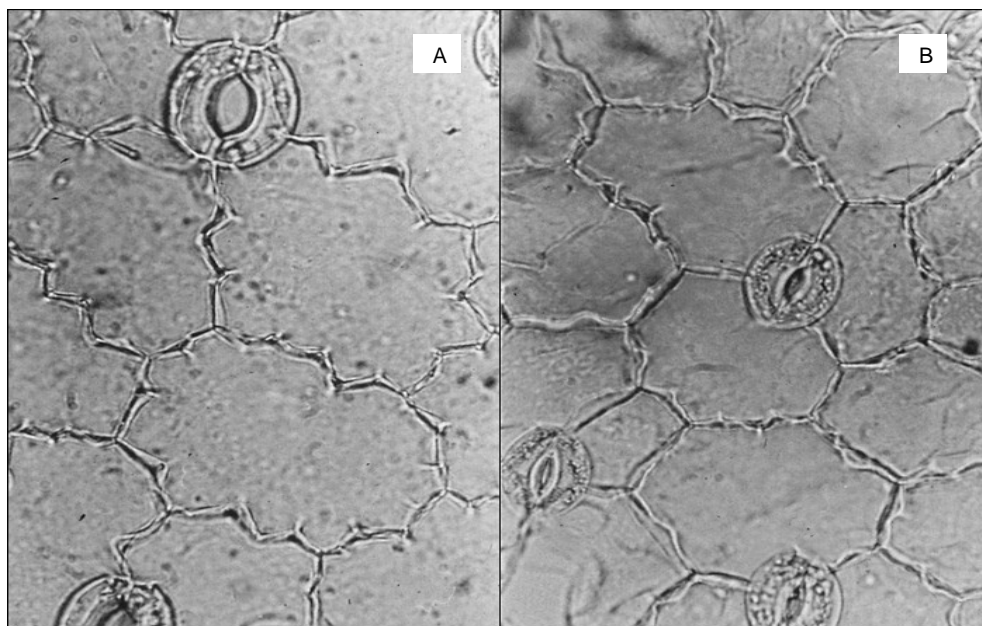


Figura 2- Vista al microscopio óptico de la epidermis superior de cotiledones de *Lotus corniculatus* (a) y *Lotus tenuis* (b) (500X).



Figura 3. Vista con microscopio estereoscópico de epicótilo y perfilo glabros en (a) *Lotus tenuis* (120 X) y pubescentes en (b) *Lotus corniculatus* (130 X).

confirmar que la pubescencia de las plántulas de entre 12 y 35 días es una característica confiable para diferenciar las dos especies, en contraposición a lo reportado por Lagler (2003). Las observaciones de pubescencia pueden efectuarse bajo lupa binocular, equipo común en los laboratorios de semillas y no requiere procesamiento complejo ni entrenamiento especial para su determinación. Si bien el estudio presenta la desventaja de que se debe esperar el desarrollo adecuado de las plántulas, este carácter es el más apropiado, desde el punto de vista práctico.

Tabla 3. Frecuencia (%) de plántulas pubescentes y glabras en 16 cultivares de *Lotus tenuis* y 12 de *L. corniculatus*. Promedio de 100 plántulas por muestra.

Plántulas	<i>Lotus tenuis</i>	<i>Lotus corniculatus</i>
Pubescentes	1	91
Glabras	99	9

El recuento de cromosomas permitió verificar la especie a la que pertenecían las muestras provistas para el estudio. En todas las poblaciones de Lt, sus placas metafásicas presentaron un número cromosómico $2n=2x=12$ mientras que en las de Lc fueron $2n=4x=24$, como era esperable según los antecedentes de Celotto & Sanso (2008), Pallares et al. (2000) y Peretti et al. (1994).

CONCLUSIONES

De los caracteres propuestos en la bibliografía y estudiados en las 16 muestras de *L. tenuis* y 12 muestras de *L. corniculatus* comparadas, solamente fueron útiles para el diagnóstico de las dos especies a partir de muestras de semillas, el recuento cromosómico y la pubescencia en el epicótilo y en el folíolo central del perfilo. En esta prueba, la diferencia estadísticamente significativa, hallada por el test de independencia indica que dichas proporciones se mantuvieron estables en cada especie. Por lo cual se concluye que es posible establecer las proporciones de las mismas en muestras de semillas. Las proporciones encontradas en las muestras pueden ser extrapoladas al lote completo (en tanto el muestreo sea efectuado correctamente), los estudios de pubescencia en plántulas serían una alternativa sencilla y confiable para determinar la pureza en mezclas de semillas de las dos especies de *Lotus*.

BIBLIOGRAFÍA

- Arambarri, A. & M. Colares.** 1993. *Lotus corniculatus* and *L. tenuis* Waldst et Kit (leguminosae) anatomy of leaf. *Lotus newsletter* 24. pp 38-40.
- Burkart, A.** 1952. Las leguminosas argentinas silvestres y cultivadas. 2ª ed. ACME, Buenos Aires. 659 pp.
- Celotto, A.I. & A.M. Sanso.** 2008. Análisis cromosómico aplicado a la diferenciación de *Lotus tenuis* y *L. corniculatus* (Fabaceae). Análisis de semillas 3(7). pp 93-96.

- D'Ambrogio de Argüeso, A.** 1986. Manual de Técnicas en Histología Vegetal. Bs.As. Ed. Hemisferio Sur S.A. 83 pp.
- Dawson, C.D.R.** 1941. Tetrasomic inheritance in *Lotus corniculatus* L. *Journal of Genetics*, 42. pp 49-72.
- Dizeo de Strittmatter, C., M. Kade & A. Valverde.** 1985. Compared morphology of the aril region in *Lotus corniculatus* L. and *Lotus tenuis* Waldst. et Kit. seeds. *Lotus Newsletter* 16:8.
- Galussi, A.A., P.D. Reinoso, L.R. Zimmerman, G.I. Soldá & L.M. Lui.** 2006. Identificación de cultivares de *Lotus* spp. por análisis de proteínas seminales. *Revista de la Facultad de Agronomía, La Plata* 106 (1). pp 21-26.
- International Seed Testing Association (ISTA).** 2008. *International Rules for Seed Testing*. Bassersdorf. Switzerland. 441 pp.
- Kade, M., M.L. Wagner, C.D. Strittmatter, R.A. Ricco & A.A. Gurni.** 1997. Identification of *Lotus tenuis* and *L. corniculatus* by flavonols. *Seed Science and Technology* 25. pp 585-587.
- Lagler, J.C.** 2003. *Lotus*. Un género que no acaba en dos especies. *Revista Forrajes y granos* 62. pp 72-76.
- Maddaloni, J. & L. Ferrari.** 2005. Forrajeras y pasturas del ecosistema templado húmedo de la Argentina. 2ª Ed. UN de Lomas de Zamora. Argentina. 522 pp.
- Milano, V.A.** 1977. Identificación de las especies forrajeras de *Lotus* por sus semillas. *IDIA* 355. pp 58-59.
- Montes, L.** 1992. Morphological and agronomical characterization of *Lotus corniculatus*. *Lotus Newsletter* 23. pp 6-8.
- Pallares, L., L. Ferrari, & M. Ritta.** 2000. Discrimination between seed storage proteins of *Lotus tenuis* and *Lotus corniculatus* by P.A.G.E. *Seed Science and Technology* 28(3). pp 769-777.
- Peretti, A.** 1994. Manual para análisis de semillas. Hemisferio Sur. Buenos Aires. Argentina. 282 pp.
- Steel, R.G.D. & J.H. Torrie.** 1988. *Bioestadística. Principios y procedimientos*. 1ª ed. español. Mc Graw Hill. México. 622 pp.
- Vignolio, O.R., N.O. Maceira & O.N. Fernandez.** 1996. Efecto del anegamiento estacional sobre la reproducción de *Lotus tenuis* y *Lotus corniculatus*. *Revista Argentina de Producción Animal. Asociación Argentina de Producción Animal*. 16 (1) pp 250-251.