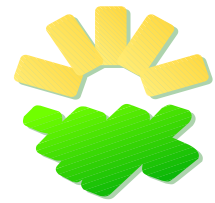




Universidad Nacional de Córdoba
Facultad de Ciencias Agropecuarias
Escuela para Graduados



**RESPUESTAS MORFO-FISIOLÓGICAS DE LA
GERMINACIÓN DE *Vicia dasycarpa* Ten. cv. Tolse F.C.A.
EN CONDICIONES DE ESTRÉS HÍDRICO Y SALINO**

Patricia Perissé

Tesis

Para optar al Grado Académico de
Doctora en Ciencias Agropecuarias

Córdoba, 2015

**RESPUESTAS MORFO-FISIOLÓGICAS DE LA
GERMINACIÓN DE *Vicia dasycarpa* Ten. cv. Tolse F.C.A.
EN CONDICIONES DE ESTRÉS HIDRICO Y SALINO**

Patricia Perissé

Comisión Asesora de Tesis

Directora: Dra. Graciela Mónica Tourn

Codirectora: Dra. María Teresa Cosa

Asesor: Dr. Juan Alberto Argüello

Tribunal Examinador de Tesis

Dra. Beatríz Gloria Galati

Dr. Carlos Passera

Dr. Juan Alberto Argüello

Presentación Formal Académica

5 de Agosto de 2015

Facultad de Ciencias Agropecuarias

Universidad Nacional de Córdoba

Agradecimientos

A mi directora Dra. Graciela Mónica Tourn, por su dedicada y paciente dirección científica, constante estímulo y los gratos momentos que compartimos en este aprendizaje.

A la Dra. María Teresa Cosa que me estimuló constantemente, por sus valiosos aportes y acompañamiento.

Al Dr. Juan Alberto Argüello por sus invaluable consejos, sugerencias y contribuciones.

Al Ing. Agr. (MSc.) Carlos Vieyra por la sugerencia, disponibilidad del material y aliento permanente.

A la Ing. (MSc.) Rita Lovey, Ing. Agr. (MSc.) María Laura Molinelli e Ing. Agr. (MSc.) Claudia Arias porque me brindaron su cariño y apoyo incondicionalmente.

A la Dra. Biól. Elsa Fuentes por sus oportunos y valiosos consejos.

A la Dra. Ing. Agr. Paola Campitelli, por su gentileza y asesoramiento en la preparación de las soluciones salinas.

Al Laboratorio de Semillas de la facultad y su personal que se preocupó por la disponibilidad de la cámara de germinación y el acceso a las instalaciones del laboratorio.

A la Técnica Gabriela Zarlavsky, por su invaluable colaboración.

Al Ing. Aer. Ricardo Luis Marini, por sus valiosos aportes e infinita paciencia en el camino de la vida que compartimos.

A la Dra. Adriana Chiappano, mi amiga, por sus consejos y fortaleza en este constante aprendizaje desde nuestra juventud.

A las autoridades de la Escuela de Graduados y la Facultad de Ciencias Agropecuarias de la UNC.

A Ricardo y Pablo Marini, Leonie y mis padres Alexis y Leonor.

Resumen

El movimiento de ganado hacia zonas marginales en Argentina ha llevado a las especies forrajeras a la heterogeneidad ambiental. Esto requiere del uso adecuado de las especies y variedades en estos entornos. *Vicia dasycarpa* Ten. cv. Tolse F.C.A., se destaca como una forrajera de ciclo otoño-invierno-primaveral que aporta materia seca de calidad. El objetivo fue estudiar las respuestas morfo-fisiológicas de la germinación de *V. dasycarpa* Ten. cv. Tolse F.C.A. en condiciones de estrés hídrico y salino. Se estudiaron las características morfológicas de la semilla en relación con la zona de entrada de agua en la imbibición. Se realizaron ensayos para establecer el porcentaje de germinación según los distintos tratamientos: testigo 0 MPa; PEG -0,3; -0,6; -0,8; -1 y -1,2 MPa; ClNa -0,3; -0,6; -0,8; -1 y -1,2 MPa. Se utilizó la metodología convencional para realizar los estudios exomorfológicos y anatómicos -microscopía estereoscópica, óptica (MO) y de barrido (MEB)-, para la ultraestructura -microscopía de transmisión (MET). Los resultados indican que la semilla presenta el hilo lineal, el micrópilo deltoide adnato al hilo, la cubierta seminal marrón rojiza oscura con vetas negras, y el patrón de ornamentación es papiloso. Se comprobó la presencia de un capuchón radicular y se identificó la presencia de dos pares de aréolas cotiledonares. La entrada de agua en la imbibición se inicia por la lente -con grietas- y avanza en el plano sagital. La germinación es criptohipógea y la plántula presenta tres catafilos fértiles (con yemas axilares desarrolladas). Bajo condiciones de estrés hídrico y salino, con un potencial agua equivalente a -0,6 MPa, se superó el 80% de germinación. Según el modelo de tiempo hídrico el potencial de base para el 50% de germinación fue de -0,9 MPa para PEG y -1,4 MPa para ClNa. Los estudios morfo-fisiológicos demostraron una disminución del crecimiento del sistema radical y caulinar en todos los tratamientos. En el sistema caulinar, las yemas axilares desarrolladas son una estrategia para la recuperación frente al estrés. La estructura anatómica de la raíz se vió afectada por el estrés hídrico y salino. Se manifestó plasmólisis celular en la rizodermis y la corteza; en los tratamientos más severos de estrés hídrico la endodermis se colapsó. *V. dasycarpa* cv. Tolse FCA, puede considerarse una forrajera promisoría para su cultivo en suelos con problemas de deficiencia hídrica o salinidad.

Palabras clave: *Vicia dasycarpa*, semilla, germinación, estrés hídrico, estrés salino.

Abstract

The movement of livestock into marginal areas in Argentina has led the forage species to environmental heterogeneity. This requires the proper use of species and varieties in these environments. *Vicia dasycarpa* Ten. cv. Tolse F.C.A. stands out as forage of autumn-winter-spring cycle that provides quality dry matter. The aim was to study the morpho-physiological responses of germinating *V. dasycarpa* Ten. cv. Tolse F.C.A. under water and salt stress. The morphological characteristics of the seeds were studied in relation to the area of imbibition water entry. Tests were conducted to determine the percentage of germination under different treatments: control 0 MPa; PEG-0.3; -0.6; -0.8; -1 and -1.2 MPa; NaCl -0.3; -0.6; -0.8; -1 and -1.2 MPa. The conventional methodology was used to perform the morphological and anatomical studies -stereoscopic microscopy, optical microscopy (OM), scanning electron microscopy (SEM)- and for the ultrastructure -transmission electron microscopy (TEM). The results indicate that the seed has a linear hilum, a deltoid micropyle; the seed coat is dark reddish brown, with black streaks and the pattern of ornamentation is papillose. It was confirmed the presence of a radicle pocket and the presence of two pairs of cotyledonal areoles were identified. It was established that the entry of water during imbibition starts at the lens -having cracks- and moves in the sagittal plane. The germination is crypto-hypogeal and the seedling has three fertile cataphylls (with its developed buds). Under conditions of water and salt stress, with a water potential equivalent to -0.6 MPa, it was overcome the 80% germination. For the hydrotime model the base water potential to reach the 50% germination was -0.9 MPa for PEG and -1.4 MPa for ClNa. The morpho-physiological studies showed a decrease in growth of both the root and caulinar system in all treatments. In the caulinar system the axillary buds developed are a recovery strategy to stress. The anatomical structure of the root was affected by water and salt stress. Cellular plasmolysis was manifested in the rhizodermis and cortex; in the most severe water stress treatments endodermis collapsed. *V. dasycarpa* cv. Tolse F.C.A. can be considered a promising forage for growing under soils with water deficiency or salinity problems.

Keywords: *Vicia dasycarpa*, seed, germination, water stress, salt stress.

TABLA DE CONTENIDO

	Pág.
LISTA DE TABLAS.....	VIII
LISTA DE FIGURAS.....	VIII
LISTA DE ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS.....	X
CAPÍTULO 1 INTRODUCCIÓN GENERAL.....	1
Marco teórico general.....	1
Antecedentes de las especies de <i>Vicia</i>	2
Características climáticas y edáficas de la Provincia de Córdoba.....	5
Enfoque del estudio.....	10
HIPÓTESIS.....	11
Objetivo General.....	12
Objetivos Específicos.....	12
CAPÍTULO 2 CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA DE LA SEMILLA Y LA PLÁNTULA DE <i>Vicia dasycarpa</i> Ten. cv. Tolse F.C.A.....	13
INTRODUCCIÓN.....	13
MATERIALES Y MÉTODOS.....	16
Material vegetal.....	16
Caracterización morfológica de la semilla y la plántula.....	16
RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	17
Características morfológicas de las semillas.....	17
Caracterización del tipo de germinación y de la plántula.....	23
Características morfo-anatómicas de la plántula normal.....	25
CONCLUSIONES.....	28

CAPÍTULO 3 ENTRADA DE AGUA EN LA FASE DE IMBIBICIÓN Y PATRÓN DE ABSORCIÓN.....	29
INTRODUCCIÓN.....	29
MATERIALES Y MÉTODOS.....	31
Zona inicial de entrada de agua.....	31
Patrón de absorción.....	31
RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	33
Zona inicial de entrada de agua.....	33
Patrón de absorción.....	35
CONCLUSIONES.....	37
CAPÍTULO 4 EVALUACIÓN DE LA GERMINACIÓN DE <i>Vicia dasycarpa</i> cv. Tolse F.C.A. EN CONDICIONES DE ESTRÉS HÍDRICO Y SALINO.....	38
INTRODUCCIÓN.....	38
MATERIALES Y MÉTODOS.....	40
Ensayos de germinación.....	40
Determinación de los parámetros de tiempo hídrico.....	41
Relación entre potenciales base y porcentajes de germinación.....	44
Ensayos de recuperación.....	45
RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	45
Evaluación de la germinación en distintas condiciones de potencial agua que simulan estrés hídrico y salino.....	45
Parámetros de tiempo hídrico.....	47
Relación entre potenciales base y porcentajes de germinación.....	48
Análisis probit para la determinación de los parámetros de tiempo hídrico.....	49
Ensayos de recuperación.....	52
CONCLUSIONES.....	53

CAPÍTULO 5 RESPUESTAS MORFO-ANATÓMICAS EN PLÁNTULAS DESARROLLADAS EN CONDICIONES DE ESTRÉS HÍDRICO Y SALINO.....	54
INTRODUCCIÓN.....	54
Respuestas de las plantas al estrés hídrico y salino.....	57
Respuestas en la germinación y el crecimiento de la plántula.....	58
Respuestas en la anatomía de la plántula.....	59
Respuestas a nivel celular.....	62
MATERIALES Y MÉTODOS.....	64
Parámetros de crecimiento.....	64
Plántulas anormales.....	64
Estudios anatómicos.....	65
RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	66
Respuestas morfológicas en plántulas desarrolladas en condiciones de estrés hídrico y salino.	66
Respuestas anatómicas en plántulas desarrolladas en condiciones de estrés hídrico y salino.	71
Respuestas a nivel de la ultraestructura radical al estrés hídrico y salino.	76
Morfología de las plántulas de semillas recuperadas.....	86
CONCLUSIONES.....	86
CAPÍTULO 6 CONCLUSIONES GENERALES.....	87
BIBLIOGRAFIA CITADA.....	90

Lista de Tablas

Tabla 4.1. Porcentajes finales de germinación para <i>V. dasycarpa</i> en distintas condiciones de potencial agua simulado con PEG y con CINA.....	51
Tabla 4.2. Comparación de los resultados obtenidos por medio de los distintos modelos....	52
Tabla 4.3. Porcentaje de semillas recuperadas.....	52
Tabla 5.1. Índice Longitud del vástago/Longitud de la raíz.....	69
Tabla 5.2. Índice Peso seco del vástago/Peso seco de la raíz (PSV/PSR).....	69

Lista de Figuras

Capítulo 1

Figura 1.1. <i>Vicia dasycarpa</i> Ten. cv. Tolse F.C.A.....	3
Figura 1.2. Distribución de precipitaciones acumuladas (mm).....	5
Figura 1.3. Lluvias mensuales promedios.....	6
Figura 1.4. Deficiencia hídrica anual (mm).....	6
Figura 1.5. Órdenes de suelos de Córdoba.....	8
Figura 1.6. Mapa ecorregional de la Argentina.....	9

Capítulo 2

Figura 2.1. Características morfológicas de la semilla de <i>Vicia dasycarpa</i> cv. Tolse F.C.A.....	18
Figura 2.2. Patrón de ornamentación de la cubierta seminal de <i>Vicia dasycarpa</i> cv. Tolse F.C.A.	19
Figura 2.3. Aréolas en <i>Vicia dasycarpa</i> cv. Tolse F.C.A.....	20
Figura 2.4. Distribución de tejidos de la cubierta seminal de <i>Vicia dasycarpa</i> cv. Tolse F.C.A.....	22
Figura 2.5. Tipo de germinación y plántula de <i>Vicia dasycarpa</i> cv. Tolse F.C.A.....	24
Figura 2.6. Características anatómicas de la plántula de <i>Vicia dasycarpa</i> cv. Tolse F.C.A.....	27

Capítulo 3

Figura 3.1. Zona inicial de entrada de agua, frente de mojado y grietas en la lente.....	34
Figura 3.2. Patrón de absorción de agua para semillas de <i>V. dasycarpa</i> que germinan en distintas condiciones de potencial agua.....	36

Capítulo 4

Figura 4.1. Gráfico ilustrativo para el cálculo del tiempo hídrico.....	42
Figura 4.2. Evaluación de la germinación de <i>V. dasycarpa</i> en distintas condiciones de potencial agua.....	46
Figura 4.3. Comparación entre los resultados experimentales y los modelizados con el tiempo hídrico.....	47
Figura 4.4. Modelo de tiempo hídrico para la germinación de <i>V. dasycarpa</i> en distintas condiciones de potencial agua.....	47
Figura 4.5. Relación entre potenciales base y porcentajes de germinación.....	48
Figura 4.6. Análisis probit de correlación para los distintos niveles de potencial agua con PEG.....	49
Figura 4.7. Análisis probit de correlación para los distintos niveles de potencial agua con ClNa.....	50

Capítulo 5

Figura 5.1. Crecimiento de las plántulas de <i>V. dasycarpa</i> , 15 días después de la siembra.....	68
Figura 5.2. Plántulas anormales de <i>V. dasycarpa</i> en los tratamientos con estrés salino.....	70
Figura 5.3. Distribución de tejidos en raíces de <i>V. dasycarpa</i> , tratamiento control.....	73
Figura 5.4. Respuestas morfo-histológicas en raíces de <i>V. dasycarpa</i> bajo estrés hídrico (PEG) y recuperadas.....	74
Figura 5.5. Respuestas morfo-histológicas en raíces de <i>V. dasycarpa</i> bajo estrés salino (ClNa) y recuperadas.....	75
Figura 5.6. Rizodermis y exodermis en condiciones de estrés hídrico, salino y recuperadas.....	78
Figura 5.7. Ultraestructura de la endodermis y el periciclo en tratamiento control.....	79
Figura 5.8. Ultraestructura de la endodermis de <i>V. dasycarpa</i> germinada en condiciones de estrés hídrico (PEG) -1,2 MPa.....	80
Figura 5.9. Comparación de células endodérmicas de raíces recuperadas del tratamiento con estrés hídrico.....	81
Figura 5.10. Detalle de células endodérmicas de raíces germinadas en condiciones de estrés salino.....	82
Figura 5.11. Ultraestructura de raíces de semillas recuperadas luego del estrés salino (ClNa Ψ_a -1,2 MPa).....	83
Figura 5.12. Recuperación de <i>V. dasycarpa</i> cv. Tolse F.C.A.....	84
Figura 5.13. Tríades en axila de catafilos y nomofilos de <i>V. dasycarpa</i>	85

Lista de Abreviaturas y Símbolos

CINa: Cloruro de sodio

FAA: Formol alcohol ácido acético

F.C.A.: Facultad de Ciencias Agropecuarias

G₅₀: 50% de germinación

MAC: Meristema apical caulinar

MAR: Meristema apical radical

MEB: Microscopio electrónico de barrido

MET: Microscopio electrónico de transmisión

MO: Microscopio óptico

MPa: Megapascal

MS: Materia seca

NMH: Nivel mínimo de hidratación

OsO₄: Tetróxido de Osmio

PEG: Polietilenglicol

PF: Peso fresco

PS: Peso seco

PSV/PSR: Peso seco del vástago/Peso seco de la raíz

OP: Optical microscopy

ROS: Especies reactivas de oxígeno

SEM: Scanning electron microscopy

TEM: Transmission electron microscopy

Tg (p): tiempo de germinación para obtener un porcentaje de germinación p

TZ: Tetrazolio (cloruro de 2, 3, 5 trifenil tetrazolio)

Θ_H: constante

Ψ_a: potencial agua

Ψ_B: potencial base

σ_{Ψ_B}: desviación estándar de los potenciales de base

INTRODUCCIÓN GENERAL

MARCO TEÓRICO GENERAL

USO DE LAS LEGUMINOSAS

El uso de las Leguminosas tradicionales (*Trifolium* spp., *Medicago* spp., *Melilotus* spp., *Lotus* spp., *Vicia* spp.) en las rotaciones de cultivos es una práctica muy antigua y aún continúa siendo un elemento importante en muchos sistemas agrícolas (Burkart, 1952; Nadal-Moyano *et al.*, 2004). Son valiosas por sí mismas, no sólo por su alto valor nutritivo especialmente proteico, sino también por aportar nitrógeno y movilizar el fósforo insoluble de los suelos, situando a las Leguminosas como un elemento imprescindible en la producción de forrajes (Carámbula, 1977; Skerman *et al.*, 1991). En tipos de vegetación más degradados, compuestos por pastos improductivos y de pobre palatabilidad, la introducción de Leguminosas induce cambios positivos (Risso y Berreta, 2001). Su importancia radica en el aprovechamiento de tierras marginales (Hacker *et al.*, 1996), por sus menores requerimientos y en zonas donde la fertilización nitrogenada está limitada por motivos económicos (Ramos Font, 2009). En zonas subtropicales se utilizan especies de Leguminosas (Fabaceas) como *Galactia volubilis* (L.) Britton, conocidas como “milk pea”, consideradas importantes forrajeras perennes por su rápido crecimiento primavero-estival y su adaptabilidad a los terrenos del sur de la Florida, donde aseguran la incorporación de nitrógeno a los suelos y son palatables para el ganado (Kretschmer, 1962). Actualmente, algunas especies de *Galactia* se están expandiendo fuera de Estados Unidos como cultivo alternativo, especialmente por su alta producción de semillas y su capacidad de ser fuente de nitrógeno en ecosistemas degradados (Muir *et al.*, 1990; Muir y Pitman, 1991), en zonas tropicales, donde otras Leguminosas tradicionales no desarrollan (Halliday, 1979; Date y Halliday, 1980; Mejía, 1984; Gil *et al.*, 1985).

ANTECEDENTES DE LAS ESPECIES DE *VICIA*

Entre las Leguminosas, el género *Vicia* comprende aproximadamente 150 especies (Kupicha, 1976, 1981), e incluye numerosas de importancia económica, cultivadas como abono verde, forraje o alimento para el hombre como *Vicia faba* L., *V. sativa* L., *V. hirsuta* (L.) Gray, *V. villosa* Roth., entre otras (Gunn, 1970; Marin *et al.*, 1998). Según Gil y Vear (1965) *V. villosa*, conocida como “veza invernal”, es reconocida en Estados Unidos como más resistente en siembras de otoño que *V. sativa*. En Europa Central su cultivo es común con el nombre vulgar de “vicia velluda” (Nadal-Moyano *et al.*, 2004). Su adopción en áreas productivas marginales se asocia con su alto potencial de resiembra natural y sus deseables atributos agronómicos, citado por Renzi *et al.* (2014).

La cátedra de Forrajes y Manejo de Pasturas de la F.C.A. U.N. Córdoba obtuvo mediante selección, a partir de una población de *V. dasycarpa* proveniente del Departamento de Agricultura de los Estados Unidos, el cultivar Tolse F.C.A. de *Vicia dasycarpa* con tolerancia a condiciones de bajas temperaturas y precipitaciones (temperaturas mínimas de -4,6 °C y 690 mm de precipitación con distribución estivo-otoñal). Este cultivar inscripto en el “Registro Nacional de la Propiedad de Cultivares”, se destaca por una alta producción de materia seca (MS) y de calidad en el estado vegetativo - 4292 kg/ha de MS y 81,98% de digestibilidad- (Coraglio *et al.*, 2001). Estudios posteriores en relación a la producción de semillas de cultivares y poblaciones de diferentes especies de *Vicia* señalan que los máximos rendimientos (1,86 t/ha) en *V. dasycarpa* cv. Tolse F.C.A. podrían explicarse por su mayor tolerancia a condiciones ambientales desfavorables (Renzi, 2008). Es así que este cultivar se presenta como una alternativa con posibilidades para ofrecer forraje de calidad en ambientes desfavorables (Fig. 1.1).

Por otro lado, a partir de la constante actualización de los nombres científicos de las especies vegetales, es importante señalar que en la actualidad *V. dasycarpa* Ten. es reconocida como sinónimo de *V. villosa* Roth subsp. *varia* (Host) Corb. (ISTA, 2007; Tropical Forages, 2009).



Figura 1.1. *Vicia dasycarpa* Ten. cv. Tolse F.C.A. A, Parcela en estado vegetativo; B, plena floración.

Con el advenimiento de la mecanización y el desarrollo de los productos químicos, la diversificación de los cultivos fue reemplazada en muchas regiones por monocultivos. Como consecuencia hubo una considerable disminución en la utilización de Leguminosas como abono verde y mejoradora de suelos. Así, los sistemas agrícolas sufren erosión, degradación ambiental y una fuerte dependencia de insumos (López Bellido, 1994, 2006).

Las condiciones de estrés ambientales, en particular la sequía y salinidad, son actualmente los principales factores que reducen la producción vegetal a nivel mundial (Sosa *et al.*, 2005), y los cambios climáticos a nivel global pueden acentuar la severidad en el futuro (Chaves y Oliveira, 2004). Entre los variados factores de estrés ambiental, la salinidad ha acaparado más atención que otros (Pessaraki, 2011), es frecuente en regiones áridas y semiáridas, y sobre todo porque se ha convertido en un problema complejo para la agricultura en aquellos países cuya economía se basa principalmente en dicha actividad (Pessaraki y Szabolcs, 2011). No obstante, está ampliamente reconocida la necesidad de la práctica de una agricultura sustentable como una estrategia de manejo. En la Argentina el desplazamiento de la ganadería hacia zonas marginales ha llevado a las especies forrajeras hacia una heterogeneidad ambiental que obliga a la utilización de especies y variedades que se adapten a estos ambientes marginales (Piñeiro y López Saubidet, 2008). De acuerdo con la FAO (1989), la agricultura sustentable frena el agotamiento y la destrucción de los recursos naturales y favorece el incremento de la productividad agrícola económicamente viable, perdurable y socialmente aceptable. Resumiendo, las Leguminosas son cultivos que se desarrollan en los sistemas con insumos relativamente bajos y son adecuados para una agricultura más sustentable (Reveneau *et al.*, 2011).

CARÁCTERÍSTICAS CLIMÁTICAS Y EDÁFICAS DE LA PROVINCIA DE CÓRDOBA

Las sequías en la Argentina son una de las principales adversidades que afectan en forma recurrente y extrema severidad a las regiones destinadas a la agricultura (Jarsún *et al.*, 2006). Según las características climáticas del territorio argentino, de los 2.800.000 km² se reconoce que el 60% de la superficie corresponde a la región árida, un 25%, a la región húmeda y el 15 % a la región semiárida, lo que determina que el 75% se encuentra en condiciones de aridez o semi-aridez (Glave, 1988). Las lluvias presentan un régimen monzónico, con un porcentaje de distribución para el semestre cálido que varía desde un 70% en el Este hasta un 85% en el Oeste del territorio provincial (Rodríguez y de la Casa, 1990), (Fig. 1.2).

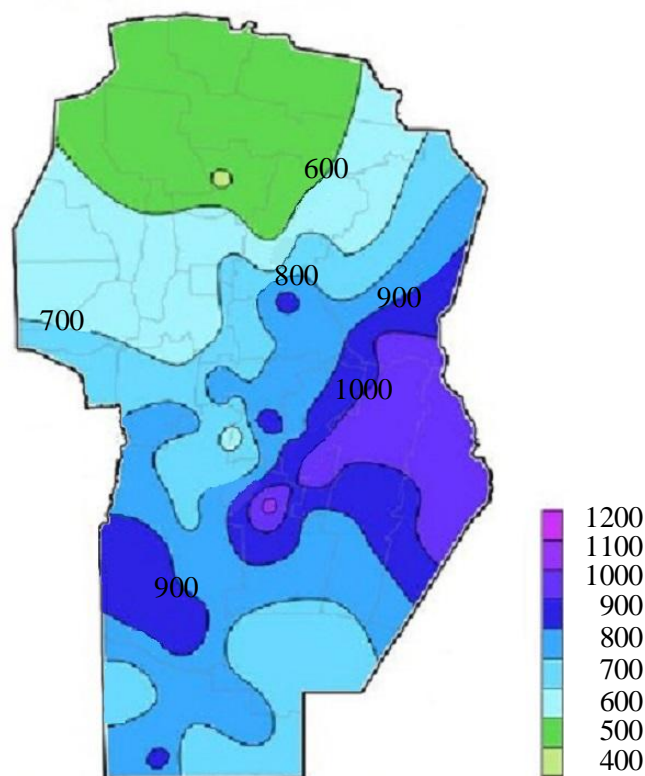


Figura 1.2. Distribución de precipitaciones acumuladas (mm). Período septiembre 2012-2013. Fuente: sistema de precipitaciones bolsa de Cereales de Córdoba.

Los promedios mensuales de precipitaciones fluctúan entre 80 mm a partir del mes de octubre, alcanzando un máximo de 120 mm en diciembre y enero, descendiendo a menos de 60 mm en marzo y abril, con un mínimo de 10 mm mensuales, entre los meses de junio y agosto (INTA Manfredi, 2011), (Fig. 1.3).

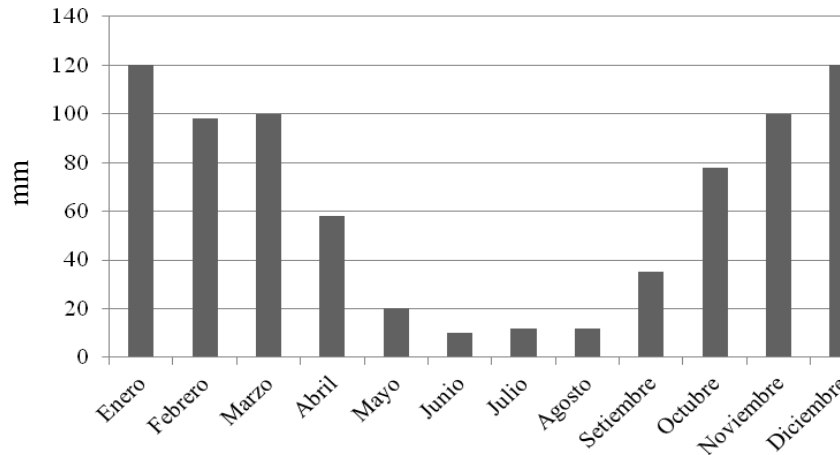


Figura 1.3. Lluvias mensuales promedio (1931-2010)

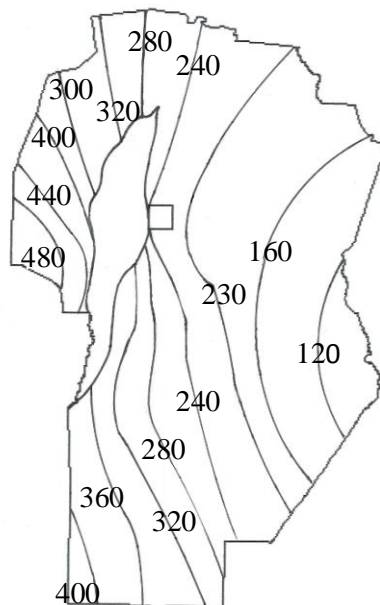


Figura 1.4. Deficiencia hídrica anual (mm). Período 1961-1990

Esto determina un significativo déficit hídrico durante el período invernal; la falta de agua promedio anual varía en forma creciente desde el este con 120 mm pasando por una faja central con 100 a 300 mm, hasta llegar al extremo oeste con 400-500 mm de deficiencia hídrica (Burgos y Vidal, 1951), (Fig. 1.4). De acuerdo con la clasificación climática de Thornthwaite (Burgos y Vidal, 1951), Córdoba presenta en la franja central norte-sur un clima subhúmedo-seco; y en el sector noroeste, clima semiárido. La gradación de climas desde subhúmedos en la porción oriental hasta los áridos en los límites con las provincias de San Luis, La Rioja y Catamarca se ven reflejados en las características de la superficie del suelo (Jarsún *et al.*, 2006).

En cuanto a los suelos, en la provincia de Córdoba predominan suelos pertenecientes al orden Molisoles (60%), suborden Ustoles, gran grupo Haplustoles típicos y énticos, son suelos eminentemente agrícolas con limitaciones (según la ubicación geográfica) relacionadas al régimen de precipitaciones. Le siguen en importancia los órdenes Entisoles (13%) Alfisoles (7%) y Ardisoles (5%), (Fig. 1.5). Los Haplustoles énticos (textura franco arenosa, franco limosa y franca) son los de mayor representatividad en la provincia y pueden presentar problemas de retención de humedad acentuada por estrés hídrico y se les reconoce una ligera salinidad; los Haplustoles típicos, bien drenados y fértiles sin embargo se han reconocido fases de erosión hídrica levemente salina. (Jarsún *et al.*, 2006).

Según el mapa de ecorregiones propuesto por Brown y Pacheco (2006), en la provincia de Córdoba se reconocen en sentido noroeste-sudeste gradualmente las ecorregiones de Chaco Seco, Espinal y Pampa (Fig. 1.6). Según estos autores las ecorregiones son grandes áreas, relativamente homogéneas, en las que hay diferentes comunidades naturales que tienen en común un gran número de especies y condiciones ambientales. El término se origina a partir de las regiones fitogeográficas o biogeográficas, pero incluye otros valores que van más allá de los biológicos.

Como se mencionó anteriormente, si bien los suelos salinos se encuentran prácticamente en todas las regiones climáticas, se concentran principalmente en zonas de climas áridos y semiáridos, donde la acumulación de sales es consecuencia de las escasas precipitaciones y la elevada evaporación y evapotranspiración (Reginato, 2009).

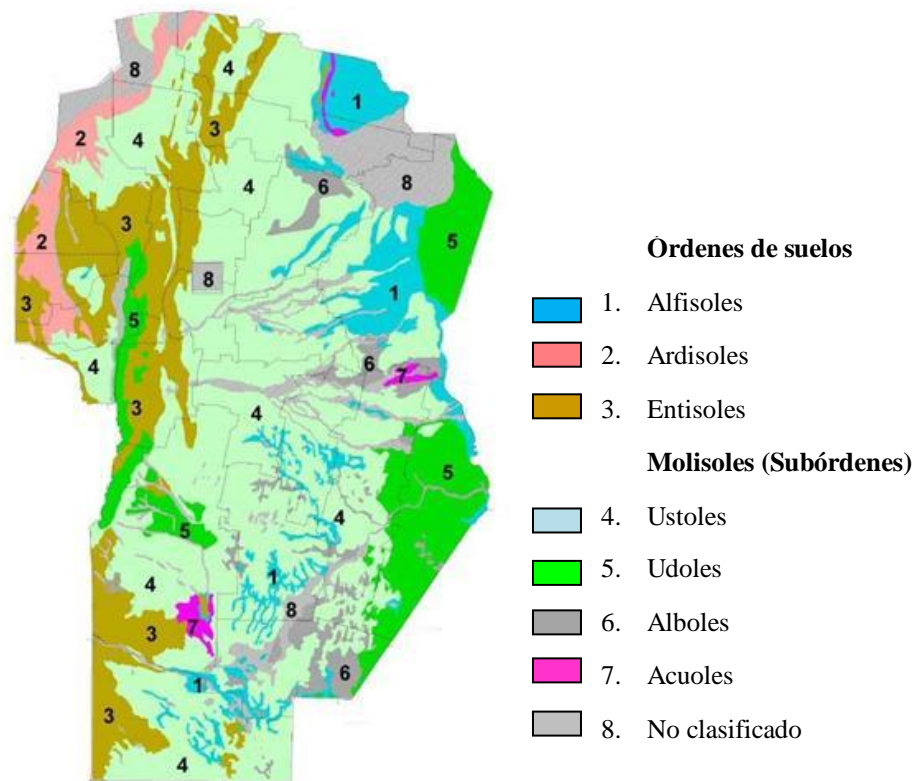


Figura 1.5. Órdenes de suelos de Córdoba. INTA, 1993.

En la región semiárida central de la provincia de Córdoba, Argentina, los regímenes térmicos y pluviales limitan el crecimiento de pasturas de Leguminosas anuales durante el período otoño–inverno–primaveral (Coraglio *et al.*, 2001). De modo que la falta de pasturas de calidad es una constante en campos de la región; por lo tanto, cualquier alternativa práctica que aumente la disponibilidad forrajera en dicho período, resultaría un incremento significativo de la productividad (Karlin *et al.*, 1994).

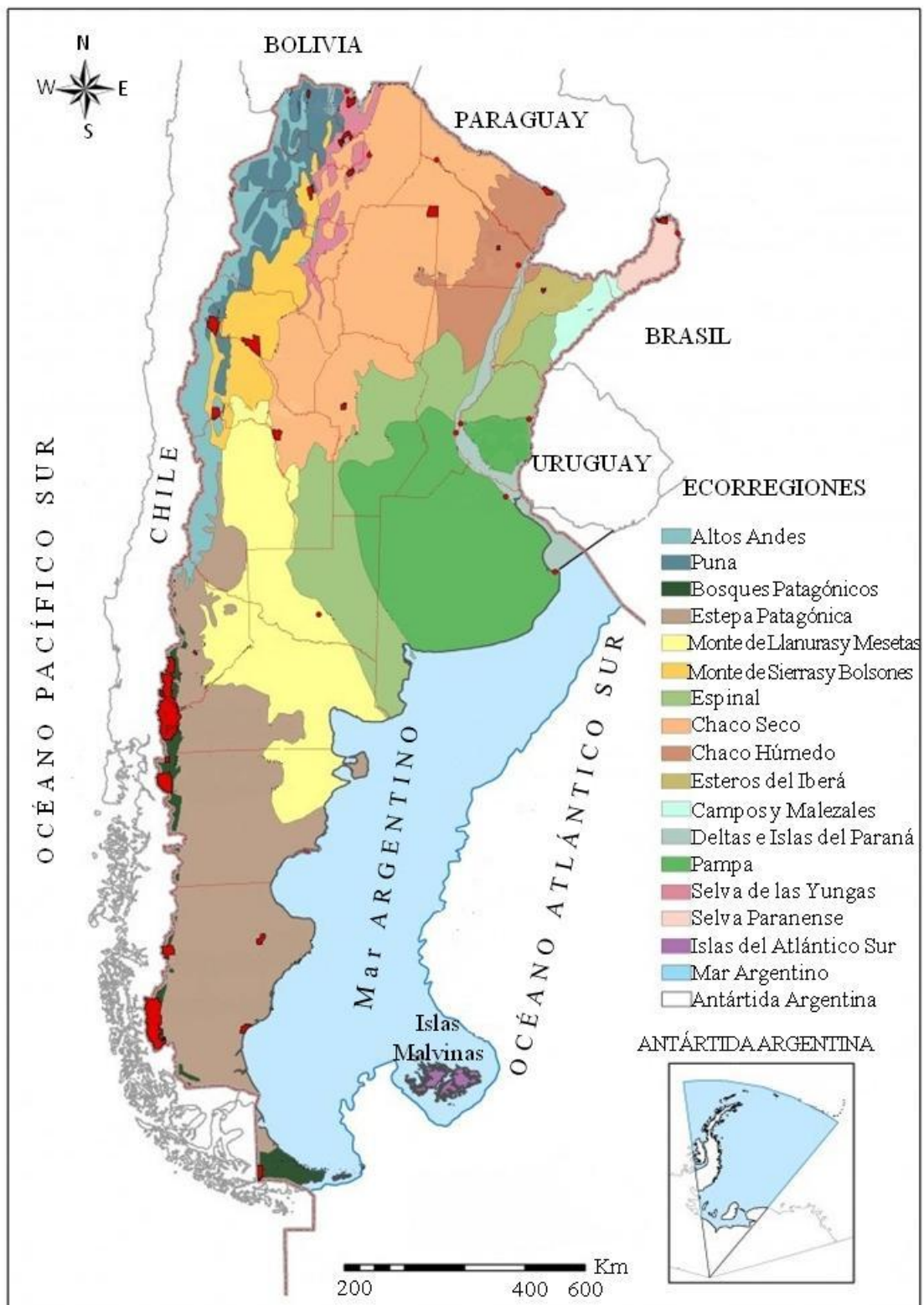


Figura 1.6. Mapa Ecorregional de la Argentina propuesto por Brown y Pacheco, 2006.

Debido al cambio climático y los procesos de desertización de ocurrencia mundial, en el futuro, una de las alternativas será cultivar especies tolerantes a condiciones desfavorables (Moreno-Fonseca, 2009). Teniendo en cuenta que el estrés abiótico impacta más claramente en ambientes marginales, está ligado globalmente con la pobreza y exagera los problemas socioeconómicos; mejorar la productividad con diversas estrategias es una llave para el alivio de la pobreza (Brown y Rieseberg, 2006).

La creciente expansión agrícola en áreas no tradicionales, ocupadas históricamente por la explotación ganadera, crea la necesidad de incrementar la producción de especies forrajeras adaptadas a condiciones edáficas desfavorables. Entre las oportunidades para mejorar la productividad de las pasturas, se destaca la búsqueda, caracterización y selección de germoplasma productivo y adaptado a ambientes marginales (Pesqueira *et al.*, 2007).

ENFOQUE DEL ESTUDIO

La morfología de las semillas de las Leguminosas ha sido ampliamente estudiada (Corner, 1976; Gunn, 1981; Manning y van Staden, 1987a; McDonald *et al.*, 1988a; Baskin y Baskin, 1998; Perissé y Planchuelo, 2004; Lackey, 2007) y es indudable la función de la cubierta seminal como defensa contra la acción de microorganismos y como la primera barrera que debe atravesar el agua durante la fase inicial del proceso de germinación (Mohamed-Yasseen *et al.*, 1994). Además, está ampliamente reconocido que el espesor de las capas celulares, así como la ornamentación de la cubierta puede presentar diferencias morfológicas significativas (Lersten, 1981; Saint Martin, 1986; Endo y Ohashi, 1998). Las investigaciones realizadas en diferentes especies de *Vicia* señalan que, si bien en general presentan un patrón de ornamentación papiloso, se observan diferencias en la distribución de las papilas y en las estrías que presentan cada una de ellas (Marin *et al.*, 1998). En relación a la imbibición en Leguminosas, se indican diferentes zonas de la cubierta seminal como lugar inicial de ingreso del agua y su distribución en la semilla (Casini, 1990; Perissé y Planchuelo, 2004). Hasta el momento, no se dispone de referencias sobre las características morfológicas y funcionales de la cubierta seminal entre las especies cultivadas de *Vicia*, por lo que se desconoce su relación con el proceso de entrada de agua y el comportamiento durante la

germinación en condiciones de estrés hídrico y salino. Surge además, la importancia de contar con modelos predictivos para alcanzar el 50% de germinación y los parámetros de tiempo hídrico. El concepto tiempo hídrico es un modelo unificador para describir los patrones de germinación que se producen en respuesta al potencial de agua (Ψ_a) del medio ambiente de la semilla (Bradford y Still, 2004).

Por otro lado, diversos autores indican, para distintas especies, que han surgido un número de estrategias adaptativas -ecológicas, morfológicas y fisiológicas- para sobrevivir en ambientes estresantes (Longstreth y Nobel, 1979; Uchiyama, 1987; De Villiers *et al.*, 1994; Aiazzi *et al.*, 2004, 2009; Tourn *et al.*, 2009; Taiz y Zeiger, 2010), que influyen en la germinación y el crecimiento temprano de las plántulas. Sin embargo, no se dispone de información en relación al comportamiento en la germinación de *V. dasycarpa* Ten. cv. Tolse F.C.A. bajo condiciones de estrés hídrico y salino, ni las respuestas morfo-fisiológicas que podrían presentarse a nivel de plántula.

Por lo anteriormente expuesto, surge la necesidad del conocimiento de la morfología de la semilla y la plántula, como así también la evaluación de la germinación en condiciones de estrés hídrico y salino de este cultivar, para justificar su implementación como una forrajera promisoría en condiciones adversas de disponibilidad de agua.

En base a lo analizado precedentemente se plantean las siguientes hipótesis:

HIPOTESIS

La germinación de *Vicia dasycarpa* Ten. cv. Tolse F.C.A. es posible en condiciones de estrés hídrico y salino debido a las grietas de la lente que facilitan el ingreso de agua, favoreciendo el crecimiento del eje hipocótilo radicular y del epicótilo.

Las respuestas morfo-fisiológicas adaptativas se explican en términos de los posibles cambios anatómicos y de la ultraestructura celular a nivel radical para facilitar la incorporación de agua y su movimiento radial y axial.

OBJETIVO GENERAL

Evaluar la germinación y las respuestas morfo-fisiológicas del cultivar Tolse F.C.A de *Vicia. dasycarpa* en condiciones de estrés hídrico y salino.

OBJETIVOS ESPECIFICOS

- Establecer las características morfológicas generales de la semilla.
- Caracterizar el tipo de germinación y plántula.
- Identificar las características morfológicas correspondientes a la plántula normal.
- Determinar la zona de entrada de agua en la semilla.
- Caracterizar el patrón de absorción de agua en la imbibición.
- Determinar el nivel mínimo de hidratación (NMH) necesario para iniciar la germinación.
- Evaluar la germinación en condiciones de estrés hídrico y salino.
- Determinar los parámetros del tiempo hídrico.
- Evaluar la recuperación de las semillas no germinadas.
- Identificar cambios morfo-anatómicos de plántulas germinadas en condiciones de estrés hídrico y salino.

CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA DE LA SEMILLA Y LA PLÁNTULA DE *Vicia dasycarpa* Ten. cv. Tolse F.C.A.

INTRODUCCIÓN

El conocimiento de la semilla madura, la identificación de sus componentes y su ubicación relativa en la semilla son fundamentales para cualquier estudio sobre la germinación (Martin, 1946; Jacobsen, 1984). La cubierta seminal es esencial para la longevidad de la semilla, la protege del posible daño por imbibición violenta, que provocaría el escape de electrolitos del embrión y ofrece protección contra las bajas temperaturas y agentes patógenos (Tully *et al.*, 1981; Mohamed-Yasseen *et al.*, 1994).

La morfología de las semillas de leguminosas ha sido ampliamente estudiada (Burkart, 1952; Corner, 1976; Polhill, 1976; Gunn, 1981; Lersten, 1981; Boeswinkel y Bouman, 1984; Manning y van Staden, 1987a; Kirkbride *et al.*, 2003 entre otros), en un principio con un enfoque filogenético y sistemático, y posteriormente tratando de establecer relaciones entre las diferentes estructuras y sus funciones.

Perrino *et al.* (1984) propusieron una clave para identificar distintas especies de *Vicia*, en base a las características seminales: forma, tamaño, hilo, lente, etc. en la cual *V. dasycarpa* y *V. villosa* se presentan como distintas especies. El carácter que las separa es la distancia del centro de la lente al hilo de 1mm o menos para *V. villosa* y mayor para *V. dasycarpa*.

Los estudios de la ornamentación de la cubierta seminal realizados en *Vicia*, mediante microscopía óptica y electrónica de barrido (MEB), muestran que existe un consenso entre los autores respecto al patrón papiloso de la misma (Gunn, 1970; Lersten y Gunn, 1982; Manning y van Staden, 1987a; Kaur y Pal, 1989; Marin *et al.*, 1998).

Sin embargo, la anatomía de la zona hilar y de la lente en las Leguminosas es compleja y puede presentar ligeras variaciones en la disposición de los tejidos que la componen según las distintas especies (Polhill, 1976; Lackey, 1981; Manning y van Staden, 1987b). Por ejemplo, la barra de traqueidas sólo se encuentra en las Faboideas y su rasgo principal son las puntuaciones, que las diferencian de las verdaderas traqueidas (Lersten, 1982). En “soja” se ha descrito un capuchón radicular McDonald *et al.* (1988a) y una estructura similar se observó en *Lupinus albus* y *L. angustifolius* (Perissé y Planchuelo, 2004) y en *Cologania broussonetii* (Balb.) DC. (Lovey *et al.*, 2009).

Últimamente, se ha prestado atención a la presencia de las “aréolas” señaladas por Endo y Ohashi (1998) y Lackey (2007) en algunas especies de Leguminosas Papilionoideas, y que anteriormente fueran citadas para diversas especies de *Glycine* como “pit” y “anti pit” *sensu* Yaklich *et al.* (1989). Estas estructuras, definidas por sus características celulares propias, se encuentran en la cara abaxial de los cotiledones, el “pit”, al que se le contrapone el “anti-pit” en la cara interna del endosperma unido a la cubierta seminal. Estudios posteriores realizados por estos autores, sugieren que el íntimo contacto entre las células de ambas superficies opuestas, que encastran en forma complementaria, las mantienen conectadas, permiten una alineación entre la cubierta seminal, el endosperma y el embrión, y explican su función nutricional durante el llenado de la semilla y también durante la imbibición (Yaklich *et al.*, 1996; Van Dongen *et al.*, 2003). La posición, forma y características de estas estructuras son datos de interés taxonómico (Sanderson y Wojciechowski, 1995; Endo y Ohashi, 1998; Lackey, 2007).

Desde los primeros tiempos de las investigaciones botánicas se ha reconocido y prestado atención a la morfología de las plántulas (Hayward, 1953; De Vogel, 1980; Basconsuelo *et al.*, 2002; Rugină *et al.*, 2006) y se la ha reconocido como el estado crítico en el ciclo de vida (Duke y Polhill, 1981) fundamental en el establecimiento e implantación de los cultivos. Se han propuesto diversas clasificaciones haciendo énfasis en distintos aspectos, De Vogel (1980) se basó en la combinación de caracteres que expresan un modo de desarrollo de la plántula; Ye (1983), con un enfoque más agronómico, enfatiza los aspectos ecológicos que determinan el tipo de plántulas presentes.

Actualmente, se trata de definir para cada especie “la plántula normal”. Las plántulas normales muestran el potencial para su desarrollo continuo hasta planta juvenil creciendo en suelos de buena calidad y bajo condiciones favorables de humedad, luz y temperatura (ISTA, 2004). En relación a las características de la plántula normal *Vicia* sp., se clasifica como plántula tipo G, grupo A-2-2-2-2-2 y se describe como de germinación hipógea con elongación de epicótilo, con una raíz principal que admite pequeños defectos si presenta suficientes raíces laterales. El epicótilo debe presentar los catafilos y la yema terminal intacta; los nomofilos pueden estar más o menos desarrollados (ISTA, 2004).

Por otro lado, algunos autores han realizado estudios morfológicos de las yemas axilares en las leguminosas argentinas: Tourn *et al.* (1996); describen los complejos axilares-una yema axilar y dos profilares fértiles-, en ejemplares adultos de *Vicia sativa* L., *V. villosa* Roth y *Vigna adenantha* (G. Mey.) Maréchal, Mascherpa & Stainier; Tourn (2004), en especies argentinas de *Galactia*, y Perissé *et al.* (2014) reconocen estos complejos en plántulas de *Cologania broussonetii* (Balb.) DC., como tácticas de supervivencia de la especie; sin embargo, hasta el momento se desconoce si *V. dasycarpa* presenta esta característica. En planta adulta Hassan y Heneidak (2006) han descripto la anatomía del tallo y la vasculatura nodal de algunas especies egipcias de *Vicia*.

En base a los antecedentes se propone como hipótesis:

En las semillas de *Vicia dasycarpa* cv. Tolse F.C.A., se reconocen características morfo-anatómicas típicas del género: patrón papiloso del episperma, capuchón radicular; embrión curvo con aréolas cotiledonares. Las plántulas de germinación hipógea desarrollan yemas axilares en los catafilos.

Los objetivos de este capítulo fueron caracterizar la morfología de la semilla, el tipo de germinación y la plántula normal de *Vicia dasycarpa* Ten. cv. Tolse F.C.A. e identificar el tipo de plántula.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material vegetal

Los estudios se realizaron con semillas de líneas mejoradas, provenientes de los cultivos realizados en parcelas de la F.C.A- U.N.C. durante el ciclo 2008. Se utilizaron semillas de frutos cosechados y trillados en forma manual, embolsadas y almacenadas a 4°C hasta el momento de realización de los ensayos. El Herbario (ACOR) y la colección de semillas de la F.C.A. guardan ejemplares representativos (N°578 AMP) del cultivar estudiado como respaldo de estas investigaciones.

Caracterización morfológica de la semilla y la plántula

Características morfológicas generales de la semilla: los estudios morfológicos se realizaron sobre cortes en distintos planos de la semilla (Lackey, 2007) analizados con microscopio estereoscópico, óptico y electrónico de barrido (MEB) y la terminología para su descripción se basó en la utilizada por Gunn (1981) y Kirkbride *et al.* (2003). La determinación del color de la cubierta seminal se realizó con las cartas de colores de suelo de Munsell (2000). El patrón de ornamentación de la cubierta seminal se estableció mediante la observación de diafanizados de la cubierta, con microscopio óptico y de barrido y se siguió la terminología propuesta por Lersten (1981) y Werker (1997). El diafanizado de la cubierta seminal, la preparación de los tacos para MEB y la determinación de las sustancias de reservas se realizaron según técnicas de Zarlavsky *et al.* (2014). La identificación de aréolas se llevó a cabo sumergiendo las semillas en solución al 1% de cloruro de 2, 3, 5 trifenil tetrazolio (TZ) durante 24 horas a temperatura ambiente, se retiró la cubierta seminal y se observó bajo microscopio estereoscópico y MEB, en el laboratorio de microscopía electrónica y análisis por rayos x (LAMARX) de la Facultad de Matemáticas, Astronomía y Física (FAMAF), UNC. El peso y la humedad de las semillas se determinaron según las normas ISTA (2004).

Caracterización del tipo de germinación y plántulas normales: la tipificación de la germinación y plántula se efectuó según la terminología propuesta por Duke y Polhill (1981), y los tipos morfológicos propuestos por Ye (1983) y De Vogel (1979,1980). Además, se realizaron cortes de los distintos órganos de las plántulas para la caracterización anatómica, utilizando distintas técnicas para su análisis con microscopía óptica (Zarlavsky *et al.*, 2014). En todos los casos se tomaron registros fotográficos.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Características morfológicas de las semillas

Las semillas de *V. dasycarpa* Ten. cv. Tolse F.C.A son de contorno circular de 3-4 x 3,5 mm. La cubierta seminal es de coloración marrón rojiza oscura (5YR, valor 2,5) con vetas negras (Fig. 2.1 A). La semilla presenta el hilo lineal (3:1) en posición lateral enmarcado por un halo o corona, el surco hilar divide en su totalidad al hilo y se observan escasos restos de funículo de coloración blanquecina que forman un arilo inconspicuo. El micrópilo es deltoide, se encuentra adnato al hilo en el extremo del lóbulo radicular (Fig. 2.1 B); la lente es discolor (negra), se encuentra sobre elevada en la línea del rafe distante 0,8 mm del extremo del hilo (Fig. 2.1 C). La semilla posee las características típicas de una semilla exendospermada aunque presenta una delgada capa de endosperma adnata al tegumento. Dicha capa forma un capuchón que protege la radícula (Fig. 2.1 D). El embrión es total de posición axial subtipo curvo, el eje hipocótilo-radicular es perpendicular al eje mayor de la semilla; la radícula es de forma triangular y la plúmula, moderadamente desarrollada es glabra; los cotiledones son similares en largo; el nudo cotiledonar y el hipocótilo quedan expuestos, la radícula permanece revestida por el capuchón radicular. (Fig. 2.1 C).

La cubierta seminal presenta un patrón de ornamentación papiloso (Fig. 2.2 A y B), determinado por la protrusión del extremo de un grupo de 10-12 macroesclereidas y por la capa cuticular que se deposita sobre la pared tangencial externa, definiendo a cada papila con extremo redondeado y flancos surcados (Fig. 2.2 C y D).

Se identificó un par de aréolas cotiledonares (pit) de contorno oval en la base de los mismos (Fig. 2.3 A-C), y su contraparte en el endosperma adnato a la cara interna de la cubierta seminal (Fig. 3 D); además, se observó un segundo par de aréolas distantes 1mm de las anteriores en la cara abaxial de los cotiledones (Fig. 2.3 A). Las células de las aréolas principales se caracterizan por la convexidad de su pared tangencial externa y otorgan una apariencia granular de la superficie de la aréola (Fig. 2.3 C).

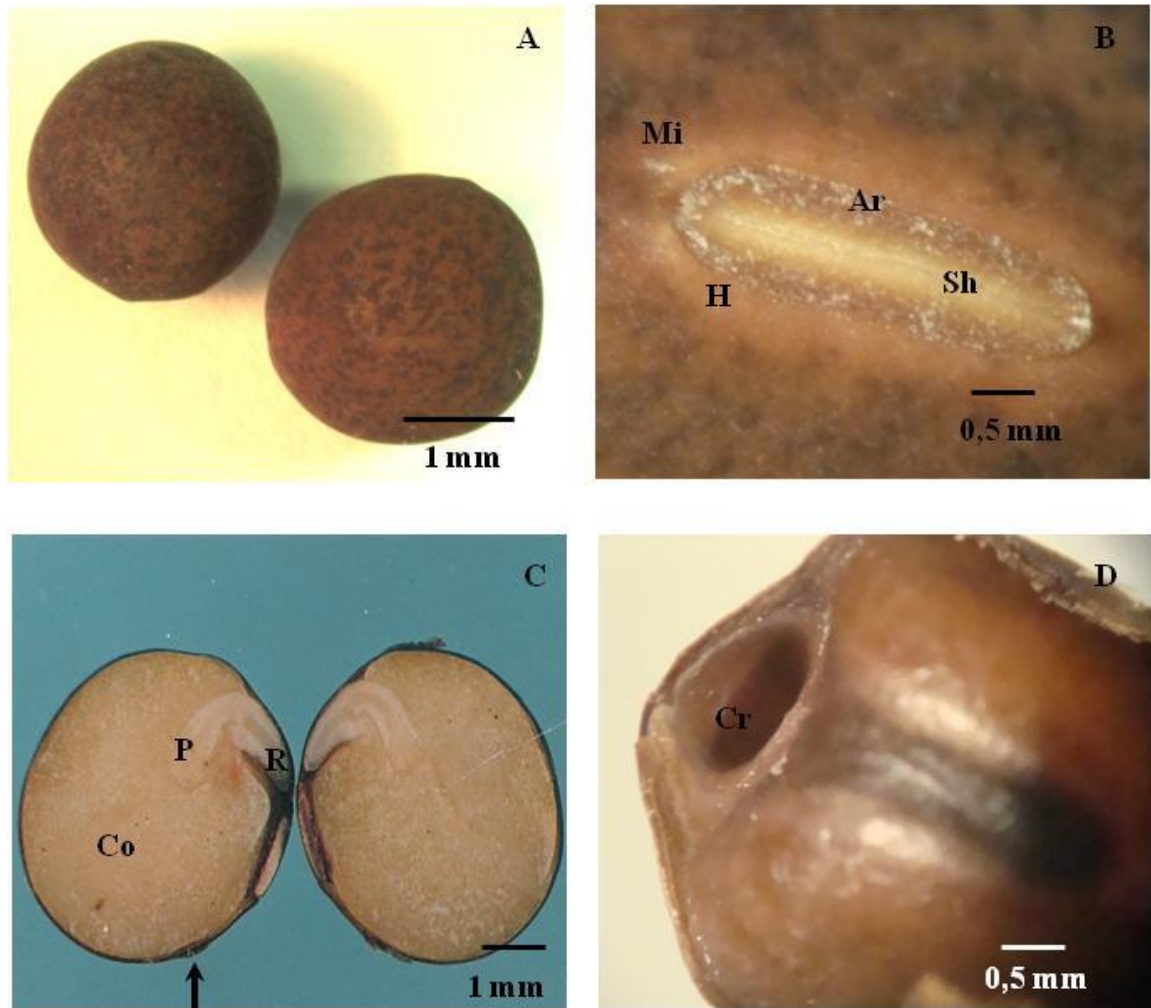


Figura 2.1. Características morfológicas de la semilla de *Vicia dasycarpa* cv. Tolse F.C.A. A, vista externa; B, detalle del hilo; C, corte sagital de la semilla; D, detalle del capuchón radicular. Ar, arilo; Co, cotiledón; Cr, capuchón radicular; En, endosperma; flecha, lente; H, halo o corona, Mi, micrópilo; P, plúmula; R, radícula; Sh, surco hilar.

Las secciones de los cotiledones analizados con microscopio óptico revelan que las células epidérmicas en la región de las aréolas son radialmente alargadas y de gruesas paredes tangenciales externas convexas, mientras que la epidermis de los cotiledones por fuera de la aréola está compuesta por células radialmente “achatas”. Además, en las aréolas las células subepidérmicas (hipodermis) se observan distintas en tamaño y contenido respecto a las que se encuentran en el resto del cotiledón (Fig. 2.3 E y F).

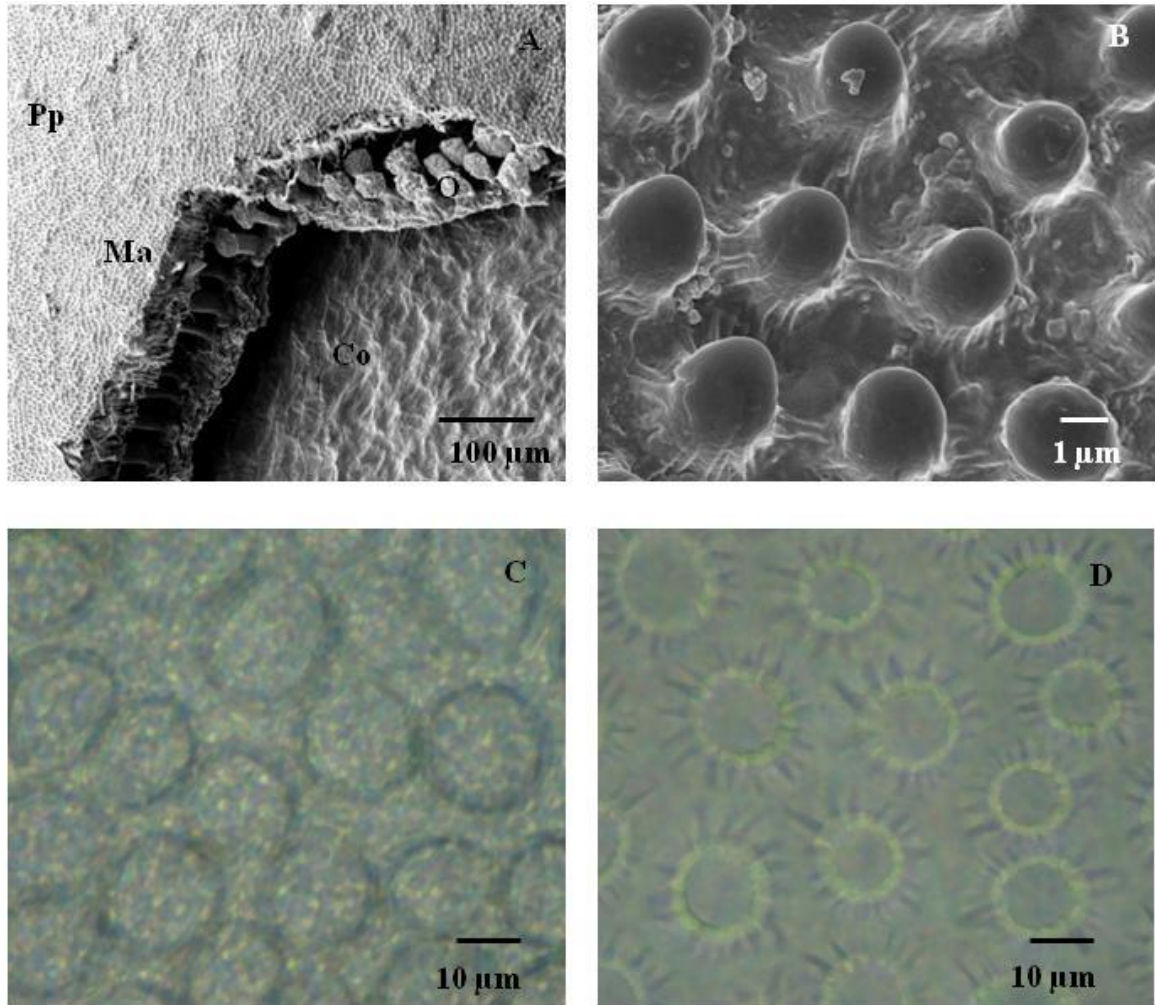


Figura 2.2. Patrón de ornamentación de la cubierta seminal de *Vicia dasycarpa* cv. Tulse F.C.A. A, fractura de la cubierta seminal; B, patrón de ornamentación papiloso MEB; C y D, diafanizado de la cubierta seminal. Co, cotiledón; Ma, macroesclereidas; Pp, patrón papiloso.

Los estudios anatómicos de cortes transversales de la cubierta seminal muestran los siguientes estratos: el primero es la epidermis, compuesta por macroesclereidas (células de Malpighi o en empalizada) dispuestas en forma compacta; el siguiente es la hipodermis, formada por osteoesclereidas (células reloj de arena o lagenoesclereidas) que presentan grandes espacios intercelulares; luego se encuentran varios estratos de células parenquimáticas comprimidas, con paredes engrosadas, que corresponden a restos del endosperma (Fig. 2.4 A).

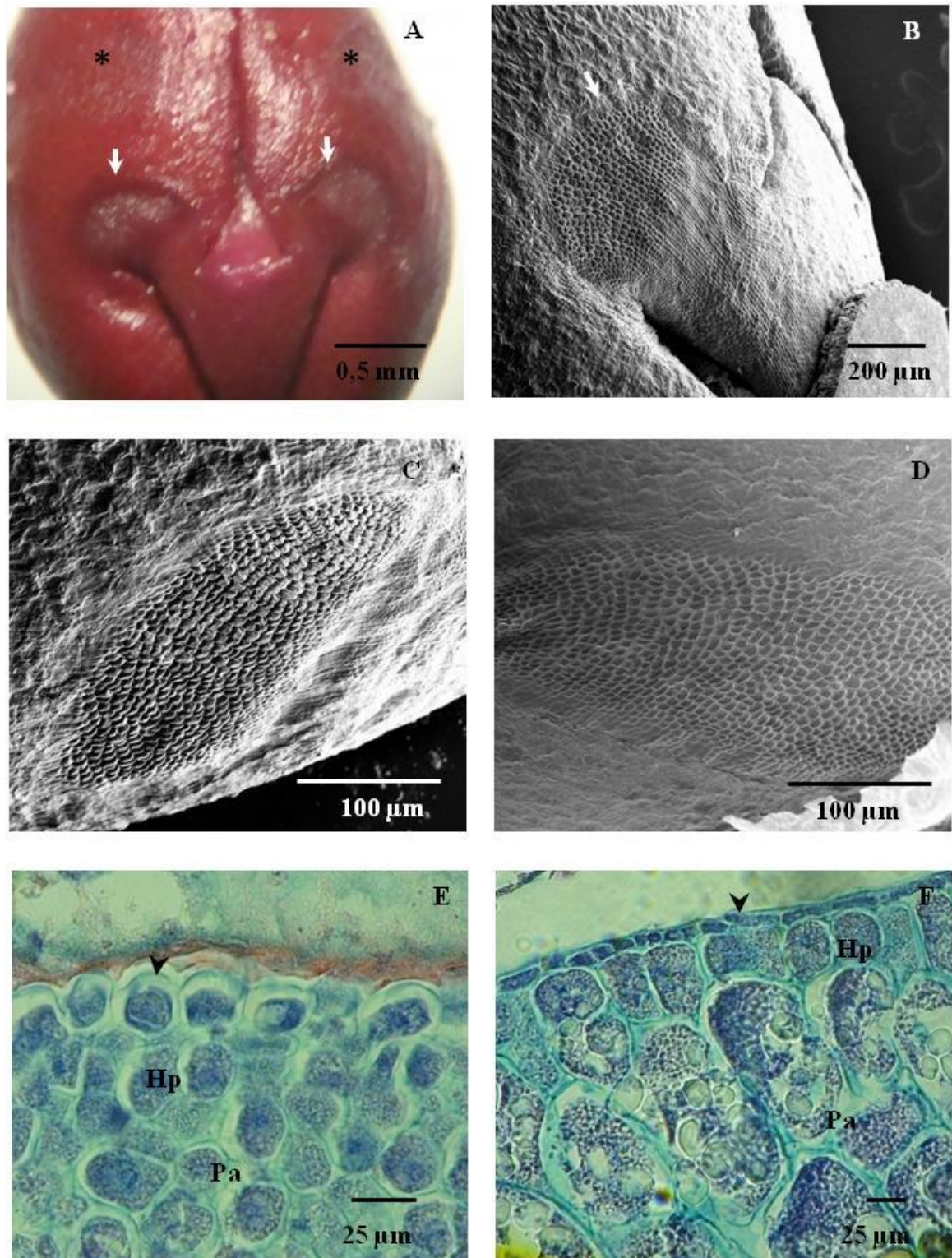


Figura 2.3. Aréolas en *Vicia dasycarpa* cv. Tolse F.C.A. A y B, ubicación de la aréolas en el embrión; C, detalle de la aréola cotiledonar principal (pit); D, complemento de la aréola en el endosperma. (antipit); E, sección en aréola; F, sección extra areolar. Asteriscos, segundo par de aréolas; cabeza de flecha, epidermis; flechas, aréolas principales; Hp, hipodermis; Pa, parénquima.

El corte transversal por la región media del hilo revela las macroesclereidas en empalizada y la contra empalizada que delimitan el surco hilar. Inmediatamente por debajo se encuentra la barra de traqueidas blanquecina, de forma ovoide rodeada por 2 capas de células parenquimáticas de paredes delgadas e incluida en un parénquima estrellado de paredes celulares significativamente engrosadas (Fig. 2.4 B y C). Se observan claramente las paredes terminales de las traqueidas, los pares de puntuaciones areoladas; algunas ligeramente verrugosas, en su mayoría sin restos de membrana (pared primaria) (Fig. 2. 4 D y E). Al mismo tiempo en la lente, se observa el gradual acortamiento de las osteoesclereidas (Fig. 2.4 F).

Las sustancias de reserva encontradas en las capas de células parenquimáticas del endosperma son proteínas y lípidos y almidón en los cotiledones. El peso promedio de mil semillas fue de $39,8 \pm 0,2$ g y el contenido de humedad de 9,6 %.

Las características exomorfológicas de las semillas concuerdan en general con las señaladas por Perrino *et al.* (1984) y Kirkbride *et al.* (2003) para *Vicia*. Sin embargo, según Marin *et al.* (1998) *V. dasycarpa* presenta semillas más pequeñas (2,2-3,5 mm) y diámetro de papilas de 1,5-3 μm en comparación con *V. villosa* (3-4 mm y 2-3 μm respectivamente). No obstante, se ha determinado que la cubierta seminal es marrón rojiza con vetas negras y además se cita por primera vez la presencia del endosperma que forma un capuchón radicular de características similares y mismo origen que los indicados en *L. albus* y *L. angustifolius* por Perissé y Planchuelo (2004) y en *C. broussonetii* por Lovey *et al.* (2009). Las funciones de este capuchón pueden estar relacionadas con la orientación del embrión durante el desarrollo de la semilla, la protección mecánica del meristema apical radical (MAR), como con el mantenimiento de la hidratación del mismo durante la imbibición y la dirección de la elongación de la radícula en la germinación, en total concordancia con las propuestas para soja por McDonald *et al.* (1988a). La característica de embrión curvo concuerda con lo señalado por Martin (1946) para varias especies de *Vicia*, aún cuando según este autor, éstas carecen de endosperma. Al mismo tiempo, se aportan características complementarias del eje embrionario y su posición respecto a los cotiledones y por primera vez se determina la presencia y características de dos pares de aréolas en esta especie.

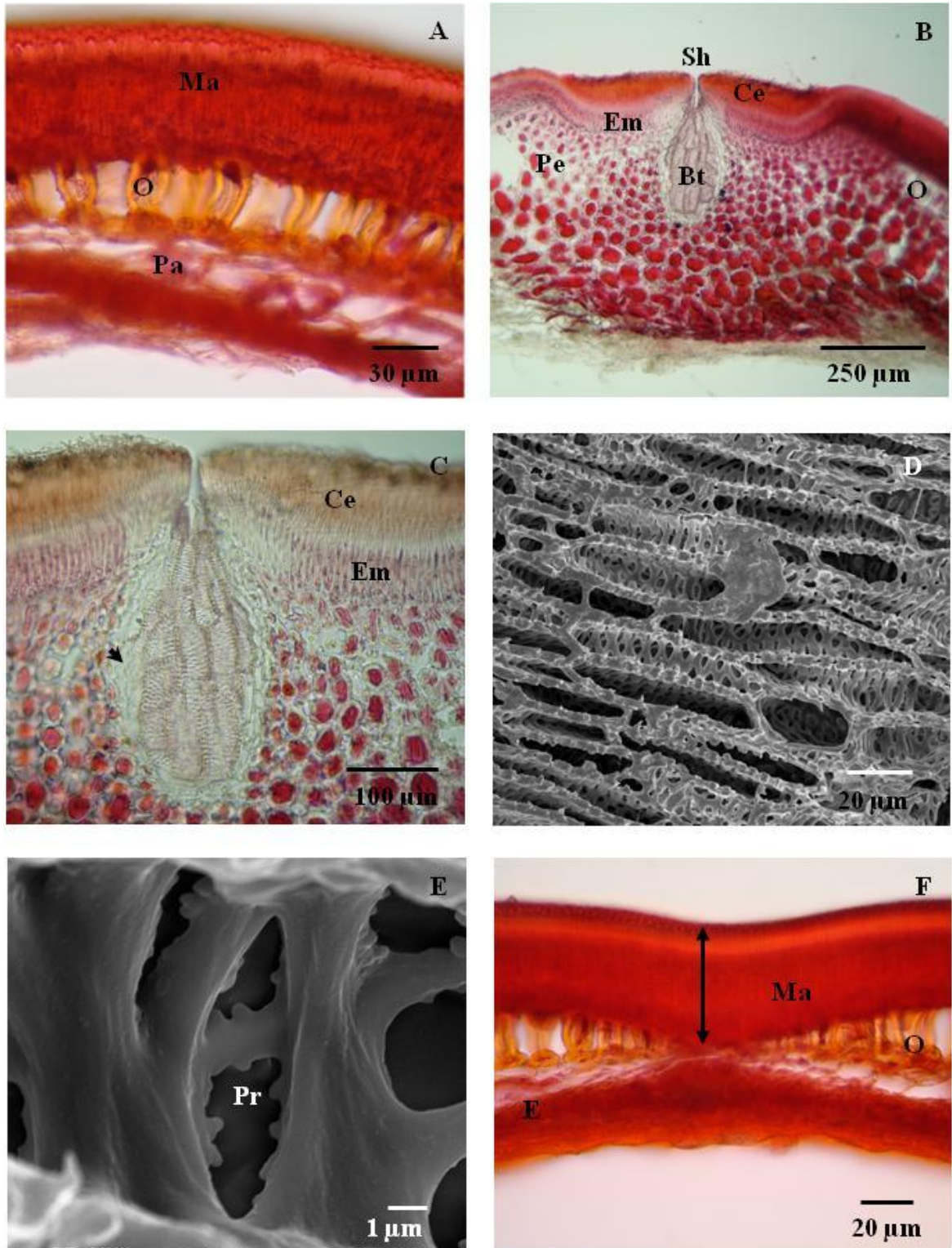


Figura 2.4. Distribución de tejidos de la cubierta seminal de *Vicia dasycarpa*. A, corte transversal de la cubierta seminal; B, corte transversal del hilo; C, detalle de la barra de traqueidas; D, detalle de traqueidas; E, puntuaciones areoladas verrugosas; F, corte transversal de la lente. Bt, barra de traqueidas; Ce, contra-empalizada; E, endosperma; Em, empalizada; Ma, macroesclereidas; O, osteosclereidas, Pe, parénquima estrellado; Pa, parénquima; Pr, puntuación areolada verrugosa; Sh, surco hilar; flecha, anillo parenquimático.

Por otro lado, según Werker (1997) este tipo de embrión, por ser de mayor tamaño que la propia semilla, representa una ventaja adaptativa para la supervivencia de las especies y por lo tanto, permite explicar el éxito en el establecimiento de la plántula. La anatomía de la cubierta seminal es consistente con la distribución de los estratos celulares típica de las Leguminosas Papilionoideas, señaladas por Kaur y Pal (1989) y Marin *et al.* (1998), entre otros. Asimismo, en concordancia con Lersten (1981) y Manning y van Staden, (1987a), se observa que el patrón papiloso está determinado por la protrusión del extremo de las macroesclereidas; sin embargo, en este trabajo se puede afirmar que cada papila se corresponde con un grupo de macroesclereidas cubierta por la cutícula a diferencia de lo señalado por Lersten (1981).

En relación a la anatomía de la región hilar, si bien los resultados en términos generales son consistentes con los de Lersten (1982) y Lersten y Gunn (1982), las puntuaciones de las traqueidas son areoladas ligeramente verrugosas; mientras que, estos últimos autores afirman que para las Vicieae están desprovistas de “cualquier verrugosidad”.

Por otro lado, estudios realizados en aréolas presentes en diversas especies de Papilionoideas (Yaklich *et al.*, 1989; Endo y Oashi, 1998; Lackey, 2007), sugieren que el íntimo contacto entre las células de ambas superficies opuestas, encastran en forma complementaria, las mantienen conectadas y permiten una alineación entre la cubierta seminal, endosperma y embrión. De esta manera se explica la función de transferencia de las células endospermas, caracterizadas por las invaginaciones de la pared celular, durante el llenado de la semilla y también durante la imbibición (Yaklich *et al.*, 1996; Van Dongen *et al.*, 2003) y que las células epidérmicas de las aréolas son más conspicuas, con apariencia granular, a diferencia de las epidérmicas del resto del cotiledón tal como lo señalan Endo y Oashi, (1998) para *Pisum sativum* L. y *Melilotus altissima* Thuill. La forma oval de las aréolas se ajusta con lo indicado por Sanderson y Wojciechowski (1995) para el clado Vicioideae.

Caracterización del tipo de germinación y de la plántula

La germinación se inicia con la emergencia de la radícula, el hipocótilo se alarga brevemente (3-4 mm), los cotiledones reservantes permanecen dentro de la cubierta seminal

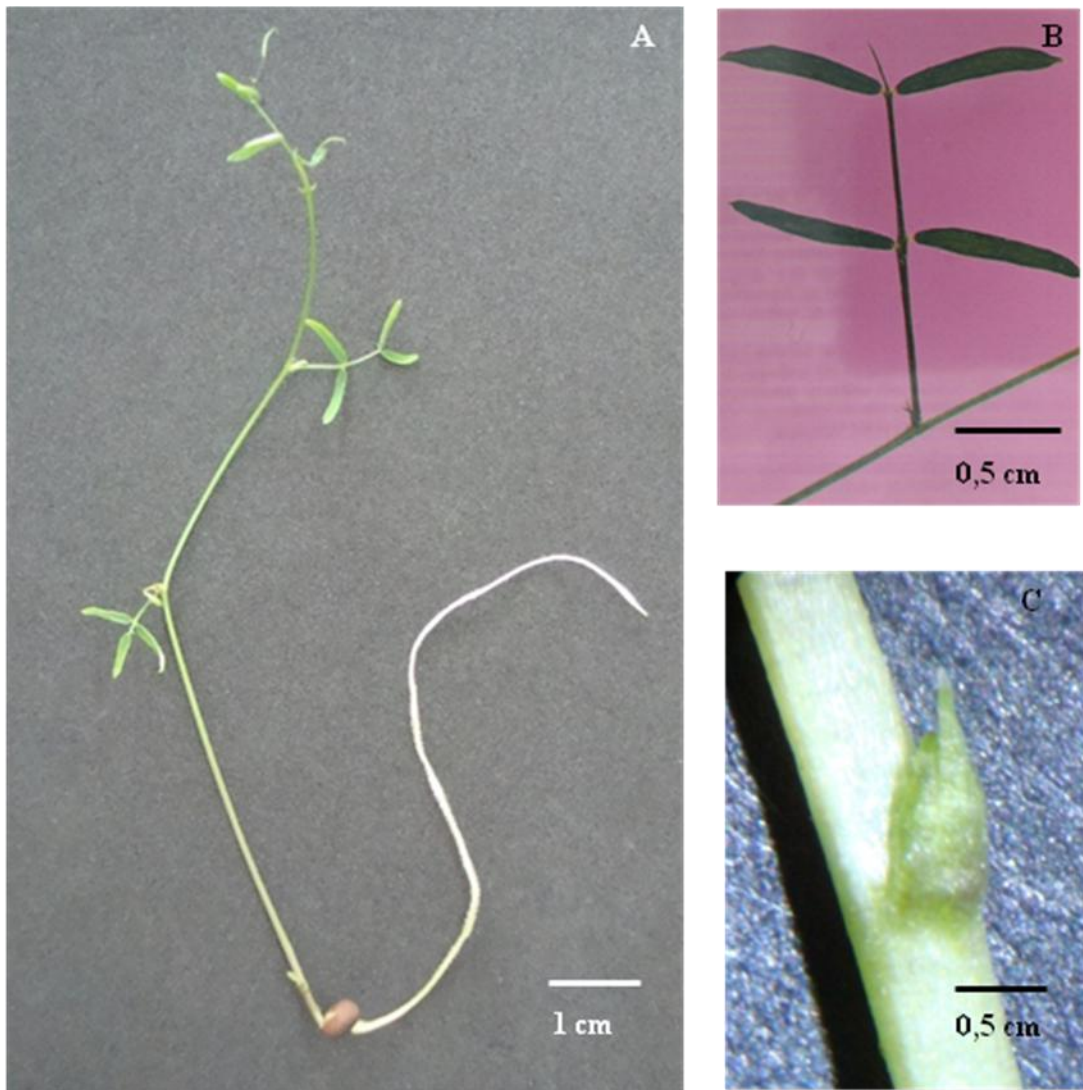


Figura 2.5. Tipo de germinación y plántula de *Vicia dasycarpa* cv. Tolse F.C.A. A, Plántula normal, germinación criptohipógea (Duke & Polhil, 1981); plántula tipo y subtipo Horsfieldia (De Vogel, 1980); Cinnamomum, (Ye, 1983). B, detalle de nomofilo. C, catafilo.

y se mantienen bajo el nivel del suelo cumpliendo la función de ceder sus reservas (Fig. 2.5). El epicótilo desarrolla lateralmente en longitud mientras persisten los cotiledones y se diferencian tres catafilos, previos al desarrollo del primer protofilo (eofilos) y luego los nomofilos (metafilos). Toda la sucesión foliar responde a una filotaxis alterna espiralada. Según este desarrollo, la germinación concuerda con el tipo criptohipógea de Duke y Polhill (1981). La plántula normal presenta raíz principal y escasas raíces laterales.

A lo largo del eje caulinar, los entrenudos delimitados por los catafilos trilobados son de sección triangular; luego de la inserción de los profilos y nomofilos se observan en el eje cuatro costillas. Los nomofilos son estipulados, peciolados, con lámina dividida compuesta por cuatro folíolos y presentan zarcillos terminales. Cabe señalar que se estableció un complejo axilar formado por tres yemas en la axila de los catafilos (1 yema axilar y 2 profilares). Este complejo es consistente con los citados por Tourn *et al.* (1996) para varias Faboideas y Perissé *et al.* (2014), para *Cologania broussonetii*. La plántula se corresponde con el tipo y subtipo Horsfieldia según De Vogel (1980), y *Cinnamomum sensu* Ye (1983). En concordancia con Duke y Polhil (1981), estas características podrían explicar ventajas adaptativas en ambientes desfavorables, ya que los cotiledones y sus sustancias de reserva permanecen bajo tierra protegidos por la cubierta seminal durante el desarrollo de la plántula hasta el momento en que se alcanza la nutrición autotrófa. En concordancia con Fahn y Cutler, (1992), la germinación criptohipógea potencia la habilidad de regeneración vegetativa cuando se pierde la parte aérea, al permanecer porciones del eje caulinar -con yemas axilares- algunos centímetros bajo tierra.

Características morfo-anatómicas de la plántula normal

Raíz primaria

La raíz presenta una epidermis unistratificada con numerosos pelos absorbentes, la corteza comprende entre 12-14 estratos de células parenquimáticas poliédricas, con abundantes espacios intercelulares; la endodermis presenta banda de Caspary, se diferencia una exodermis. En el cilindro central se observan el periciclo unistrato y divisiones periclinales frente a los polos del protoxilema, para dar continuidad al cambium que se encuentra entre los tejidos vasculares, lo que indica una inicial actividad cambial. La raíz es triarca, presenta 2-4 miembros de vaso de protoxilema en cada polo y centrípetamente se diferencian 4 miembros de vaso del metaxilema de aproximadamente 23,5 μm de diámetro. En el floema, que se dispone en cordones alternos, se observan conspicuos cordones de fibras floemáticas (Fig. 2.6).

Hipocótilo y zona de transición

El pasaje entre la distribución de los tejidos vasculares en la raíz y la estela del tallo resulta compleja de dilucidar en esta especie, ya que no se completa en el nudo cotiledonar, sino que ocurre en dirección acrópeta a lo largo del hipocótilo comprende el epicótilo, e incluye nudos superiores donde se desarrollan los catafilos. A lo largo del hipocótilo se observa una estructura intermedia entre raíz y tallo. En la región central a partir de la estructura típica de raíz triarca donde alternan los cordones de xilema y floema, comienzan a diferenciarse en dirección centrifuga -a partir de tejido meristemático- miembros de vaso del xilema dando origen a una estructura tangencial, que luego se superpone con la organización de hacecillos colaterales, entre los cuales dos, corresponden a los siguientes nomofilos. Estas observaciones concuerdan con las realizadas en *Pisum sativum* L. por Hayward (1953) y más recientemente con Ruginá *et al.* (2006), sin embargo estos últimos señalan que la zona de transición no está relacionada con la germinación hipogea de la especie. Esta afirmación se puede confirmar teniendo en cuenta los estudios realizados por Basconsuelo *et al.* (2002) quienes estudiaron la zona de transición en distintas especies de la tribu Phaseolae con germinación criptohipógea y cuya transición ocurre enteramente en el hipocótilo, sin rotación e inversión de elementos xilemáticos.

Epicótilo

En el corte transversal del nudo de cada catafilo se observa una yema axilar con un perfil fértil, este conjunto constituye un complejo axilar donde uno de los dos perfiles (alfa y beta) desarrolla una yema axilar. El entrenudo por sobre el primer nomofilo, presenta sección romboidal con 4 costillas, dos más conspicuas (alas) que alternan con sus correspondientes valles. La epidermis es unistratificada compuesta por células epidérmicas propiamente dichas heterogéneas (algunas mas grandes) semicirculares con una delgada cutícula. Subepidérmicamente en la corteza se diferencian de 3-4 capas de clorénquima continuo, las costillas se corresponden con la presencia de casquetes de fibras. Los hacecillos colaterales abiertos, se disponen uno en correspondencia con cada una de las alas (haces corticales *sensu* Hassan y Heneidak, 2006) e internamente inmersos en un parénquima incoloro, se disponen 4 hacecillos; sin embargo a diferencia de lo citado por

Hassan y Heneidak (2006), es muy escaso el desarrollo de colénquima. La médula está compuesta por un parénquima incoloro (Fig. 2.6 B).

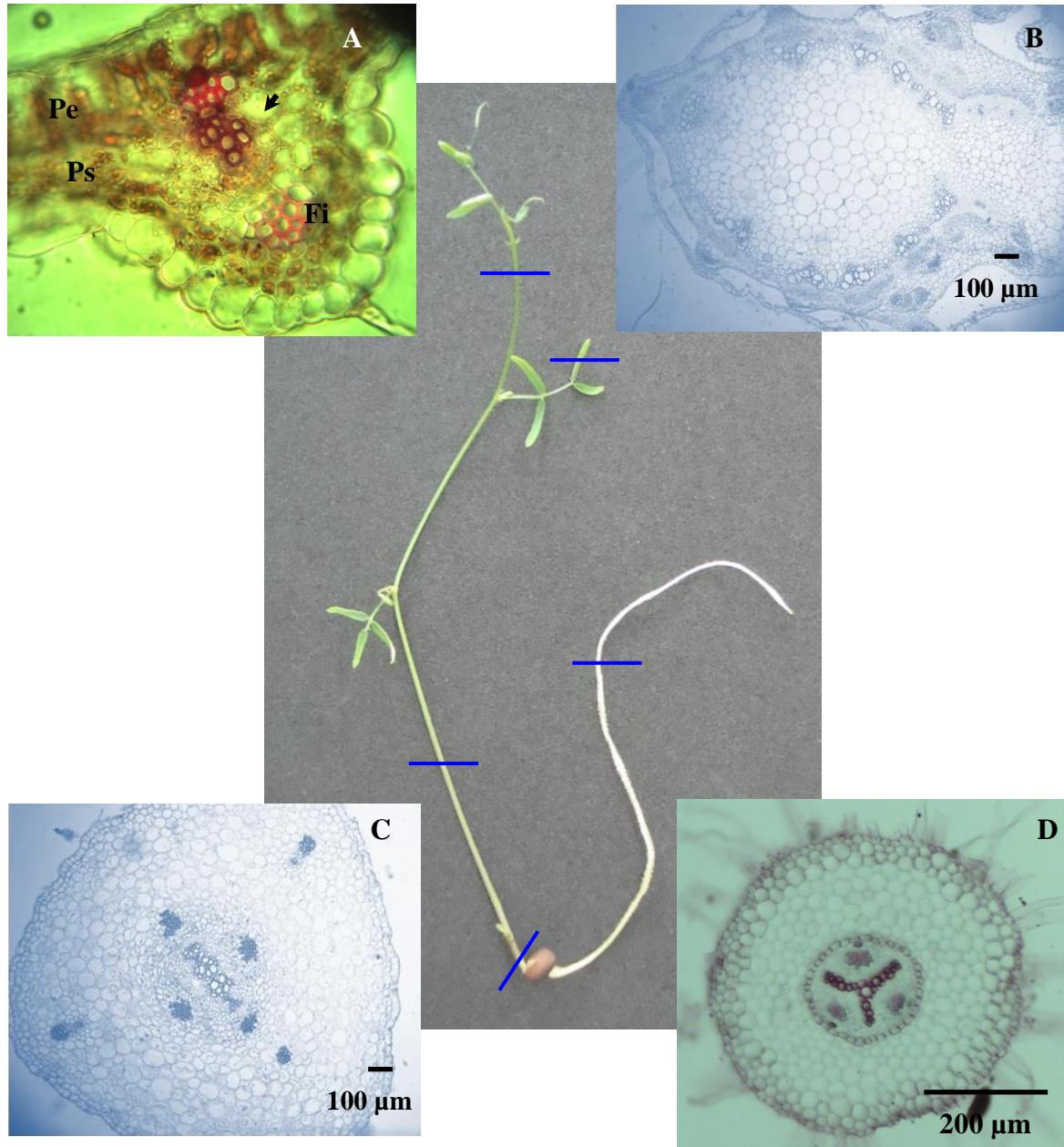


Figura 2.6. Características anatómicas de la plántula de *Vicia dasycarpa* cv. Tulse F.C.A. A, foliolo; B, epicótilo; C, transición, D, raíz. Fi, fibras; Hc, hacecillo cortical; Pe, parénquima en empalizada, Ps, parénquima esponjoso; flecha, vaina parenquimática.

Nomofilos

La epidermis es unistratificada con células propiamente dichas prismáticas en sección transversal, alargadas y de contorno onduladas en vista superficial. Los estomas anisocíticos, se disponen al mismo nivel que las células epidérmicas y los folíolos son anfiestomáticos. En sección transversal, el mesofilo es dorsiventral y comprende tres estratos de clorénquima en empalizada continuo en toda la cara adaxial y cinco de clorénquima esponjoso. Se observan escasos tricomas glandulares y eglandulares, en concordancia con los citados por Kupicha (1981) para *Vicieae*. El haz principal es colateral y está rodeado por una vaina parenquimática (Fig. 2.6 A).

CONCLUSIONES

Las evidencias experimentales permiten establecer que la cubierta seminal de este cultivar presenta particularidades en el patrón de ornamentación papiloso, en el cual cada papila está determinada por un grupo de macroescleridas y la cutícula que las cubre. Además, la radícula del embrión se encuentra rodeada y protegida por un capuchón radicular de origen endospermico. Los elementos traqueales que forman la barra de traqueidas en el complejo hilar, presentan puntuaciones areoladas ligeramente verrugosas, que junto con las aréolas cotiledonares constituyen rasgos apomórficos entre las Papilionoideas. Es importante destacar que por primera vez se cita y caracteriza la presencia de aréolas cotiledonares en un cultivar de esta especie. Las características en relación a la germinación criptohipógea, al tipo de plántula y a la presencia del complejo axilar en los catafilos, permitirían explicar ventajas adaptativas de este cultivar frente a factores adversos en la germinación y el establecimiento de las plántulas. Las yemas del complejo axilar, reemplazarían a la yema terminal en el caso de que ésta resultara dañada. Estos rasgos pueden coincidir, por un lado, con el largo proceso de selección natural, y por otro, con la domesticación realizada en un principio por los agricultores, y más recientemente por el mejoramiento vegetal llevado a cabo para la obtención de este cultivar.

ENTRADA DE AGUA EN LA FASE DE IMBIBICIÓN Y PATRÓN DE ABSORCIÓN

INTRODUCCIÓN

La disponibilidad de agua para la rehidratación de la semilla es un requisito indispensable para iniciar la germinación (Koller, 1972); y la fuerza directriz del movimiento de agua hacia la semilla depende del gradiente de potencial agua entre la semilla y el suelo (Bewley y Black, 1994).

Están indicadas diversas regiones de la semilla como lugares iniciales de entrada de agua, Kyle (1959) asoció al micrópilo en *Phaseolus vulgaris* L., Rangaswany y Nandakumarn (1985) al micrópilo y al hilo en *Rhynchosia minima* (L.) DC., Hu *et al.* (2009) señalaron al hilo en *Vigna oblongifolia* A. Rich. Por otro lado, Manning y van Staden (1987b), en un estudio en *Sesbania punicea* (Cav.) Benth., demostraron que el ingreso de agua comenzó por la lente, al igual que Koizumi y Kano en *Vicia faba* L. En soja (*Glycine max* (L.) Merr.) se estableció que la zona inicial de ingreso es la opuesta al hilo, donde se forman pliegues por el aumento de volumen y la creación de fuerzas de expansión, cuando el agua es absorbida por las paredes la cubierta seminal (Casini, 1990; Ma *et al.*, 2004; Meyer *et al.*, 2007); mientras que, en *Lupinus albus* L. y *L. angustifolius* L. el ingreso del agua se inició en la lente, donde se detectaron poros (Perissé y Planchuelo, 2004), al igual que en *Medicago sativa* L. cv. Baralfa 85 (Galussi, 2011).

Las semillas con cubiertas permeables generalmente exhiben un proceso trifásico de absorción de agua, que consiste en una primera fase denominada de imbibición, una segunda de activación metabólica, y la tercera fase, de crecimiento (Hadas y Russo, 1974; Bewley y Black, 1994; Bradford, 1995). El movimiento y la velocidad de entrada del agua durante el proceso de imbibición dependen tanto de las características intrínsecas de las semillas como

de la permeabilidad de la cubierta seminal. A su vez, la permeabilidad está influenciada por la morfología, la estructura, la composición y el contenido inicial de humedad de la semilla. Por lo tanto, según Sharma (1973), el patrón de absorción es difícil de predecir. Además, es un hecho establecido que las semillas deben absorber una cierta cantidad de agua, hasta alcanzar el nivel mínimo de hidratación (NMH), para que se desencadene el proceso de la germinación (Hunter y Erickson, 1952; Koller, 1972; Hadas y Russo, 1974; Hadas 1977).

Respecto a la absorción de agua de la semilla en soja, McDonald *et al.* (1988a) señalaron que se observaron pliegues en la cubierta en la zona opuesta al hilo al iniciarse el proceso de imbibición. Además, Le Deunff *et al.* (1989), definieron tres estados morfológicos de la semilla de “lupino blanco”, asociados con su nivel de hidratación: semilla rugosa (30% de imbibición), semilla blanca (40% de imbibición), y semilla amarilla (63% de imbibición), sin establecer relación alguna con la morfología de la cubierta. Sin embargo, para *V. dasycarpa* aún no se han determinado la zona inicial de entrada de agua, el patrón de absorción, ni se reconocen aquellos estados morfológicos.

Por otro lado, según Hegarty (1978), la respuesta de la semilla al déficit hídrico está relacionada con el alcance de un umbral de contenido de agua que le permita dar inicio a la elongación celular y a la emergencia de la radícula. Por lo tanto, es necesario determinar las variaciones en el patrón de absorción de las semillas de *V. dasycarpa*, cuando se encuentran en medios con distintos potenciales agua debido a diferentes condiciones de estrés hídrico y salino.

En base a estos antecedentes se propone la siguiente hipótesis:

La entrada de agua en *V. dasycarpa* se produce a través de las grietas en la lente, y a medida que disminuye el potencial agua, el patrón de absorción se retrasa hasta tanto se alcance el nivel mínimo de hidratación.

Los objetivos de este capítulo fueron: determinar la zona por donde comienza entrada de agua en la imbibición y su relación con las características de la cubierta seminal, caracterizar el patrón de absorción, y determinar el nivel mínimo de hidratación.

MATERIALES Y MÉTODOS

Como se detalla en el Capítulo 2, se utilizaron semillas de *Vicia dasycarpa* cv. Tulse F.C.A., provenientes de una parcela del campo experimental de la Facultad de Ciencias Agropecuarias de la UNC. Las semillas fueron cosechadas en el mes de diciembre de 2008 y conservadas a 4 °C, con un contenido de humedad del 9,6% (96 gramos de agua por kilogramo de materia seca). Las semillas se colocaron a temperatura ambiente 24 horas antes de la iniciación de los ensayos (Lafond y Baker, 1986).

Zona inicial de entrada de agua

Se sumergieron las semillas en una solución al 1% de cloruro de 2, 3, 5 trifenil tetrazolio (TZ) a 20 °C, en oscuridad. A medida que las semillas manifestaban los primeros signos de imbibición, por la presencia de pliegues en la cubierta, fueron removidas de la solución. Luego, se secaron entre toallas de papel a fin de absorber cualquier exceso superficial de la solución y se expusieron a una fuente luminosa, con la finalidad de activar el proceso de reducción del tetrazolio a formazán (compuesto insoluble de coloración roja), como indican Casini (1990) y Perissé y Planchuelo (2004). Las zonas de la cubierta seminal marcadas como zonas iniciales de entrada de agua se observaron con lupa y microscopio electrónico de barrido (MEB), siguiendo la metodología aplicada en el Capítulo 2.

Patrón de absorción

Se colocaron diez semillas, previamente pesadas en una balanza Mettler AB con una precisión de 0,1 mg, en cajas de plástico de 15x15x9 cm, en cuya base se colocó papel de germinación embebido en distintas soluciones según el tratamiento, para obtener los diferentes potenciales agua Ψ_a (0 para el control con agua destilada, -0,3; -0,6; -0,8; -1 y -1,2 MPa). El osmolito utilizado para simular estrés hídrico fue polietilenglicol (PEG 6000). Los potenciales agua se obtuvieron a partir de distintas concentraciones de PEG, según la fórmula de Michel (1983). Para simular las condiciones de estrés salino se utilizaron soluciones de cloruro de sodio (ClNa) en distintas concentraciones, equivalentes a -0,3; -0,6; -0,8; -1 y -1,2 MPa según la metodología de Sosa *et al.* (2005). Posteriormente, los potenciales agua se controlaron con un microvoltímetro de punto de rocío, marca Wescor. El sustrato se

humedeció con las diferentes soluciones en una relación volumen de solución/gramos de papel de 14 según el tratamiento (Emmerich y Hardegee, 1991).

Las condiciones que se implementaron fueron las sugeridas por ISTA (2004) para esta especie. Se aplicó un pre tratamiento de enfriamiento a 5 °C durante 7 días, el papel fue humedecido con la solución correspondiente a cada tratamiento durante este periodo. Para los tratamientos con PEG, como es un carbohidrato cuya dilución se ve afectado por la temperatura, se prepararon las soluciones correspondientes, para el período a 5°C y para el período en cámara de germinación a 20°C. Para mantener constante el potencial agua se renovó el papel de germinación con soluciones frescas de PEG y cloruro de sodio cada 72 horas. Para evitar diferencias de potencial agua por evaporación y exclusión, las cajas de germinación se taparon y colocaron en bolsas plásticas cerradas. Luego del pre tratamiento en frío las cajas se trasladaron a la cámara de germinación a 20 ± 1 °C con luz fluorescente fría de 800 a 1200 Lux, con períodos de 8 horas de luz y 16 horas de oscuridad (ISTA, 2004). Para la caracterización del patrón de absorción de agua del tratamiento control y los distintos potenciales agua, se pesaron las semillas a diferentes intervalos, siendo más frecuente la lectura para las primeras horas de comenzado el ensayo (Hadas y Russo, 1974; Lafond y Baker, 1986). Se consideró semilla germinada aquella que presentó 2 mm de radícula a través de la cubierta seminal (Hadas y Russo, 1974).

Se determinó el patrón de absorción de agua en función del tiempo, midiendo los gramos de agua absorbida en los diferentes intervalos, en relación con la unidad de peso fresco (PF) (Le Deunff *et al.*, 1989). Para la variable respuesta, gramos de agua absorbida, se identificó y ajustó un modelo no lineal, con la variable independiente número de horas. Los modelos ajustados fueron comparados para determinar patrones semejantes en función del tiempo.

Se confeccionaron las curvas de absorción de agua en función del tiempo, y se determinó el nivel de absorción a partir del cual comienza la fase de crecimiento de la radícula, al que se denominó nivel mínimo de hidratación (NMH).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Zona inicial de entrada de agua

La región por donde comienza el ingreso de agua queda evidenciada por la reacción del tetrazolio y luz, que produce una coloración roja en dicha región de la semilla (en el embrión) durante la imbibición. Se puede apreciar que la zona que primero se colorea es la lente (estado 1) y luego la zona inmediata posterior a ésta (estado 2). El frente de mojado avanza en forma periclinal en el plano sagital (Fig. 3.1 A-B). Las evidencias experimentales demuestran que en *V. dasycarpa* existe un movimiento de agua desde la lente y zona posterior a la lente hacia los laterales y el extremo del lóbulo radicular. La imbibición produce la hidratación de los tejidos de la cubierta seminal y por consiguiente el ablandamiento de ésta, y a continuación se hidrata el embrión.

En *V. dasycarpa*, a diferencia de lo señalado para el “lupino blanco” (Le Deunff *et al.*, 1989) y la “soja” (McDonald *et al.*, 1988a; Ma *et al.*, 2004 y Meyer *et al.*, 2007), no se formaron pliegues en la parte dorsal (antirafe) de la cubierta seminal. Sin embargo, se observó una ligera separación entre la cubierta seminal de los cotiledones en la región de la lente, similar a lo informado por Perissé y Planchuelo (2004) en *L. angustifolius* L. La ausencia de pliegues en esta especie podría explicarse teniendo en cuenta el espesor relativamente uniforme de la cubierta seminal en las regiones extra hilares, en las cuales no se generan tensiones, produciéndose una hidratación pareja que evita el plegado.

Es importante recordar que la región de la lente es la zona de mayor espesor de la cubierta seminal, y por lo tanto tendría que ser la que ofrece mayor resistencia al paso del agua. Sin embargo, esta región observada al microscopio electrónico (MEB) reveló la presencia de grietas (Fig. 3.1 C-D), y esto demuestra que éstas son la vía de ingreso de agua en la semilla

Los resultados son consistentes con la afirmación de Manning y van Staden (1987b) y Koizumi y Kano (2014) respecto a la función de la lente, con la presencia de grietas en “soja” indicadas por Ma *et al.* (2004), lo señalado por Perissé y Planchuelo (2004) en los “lupinos”,

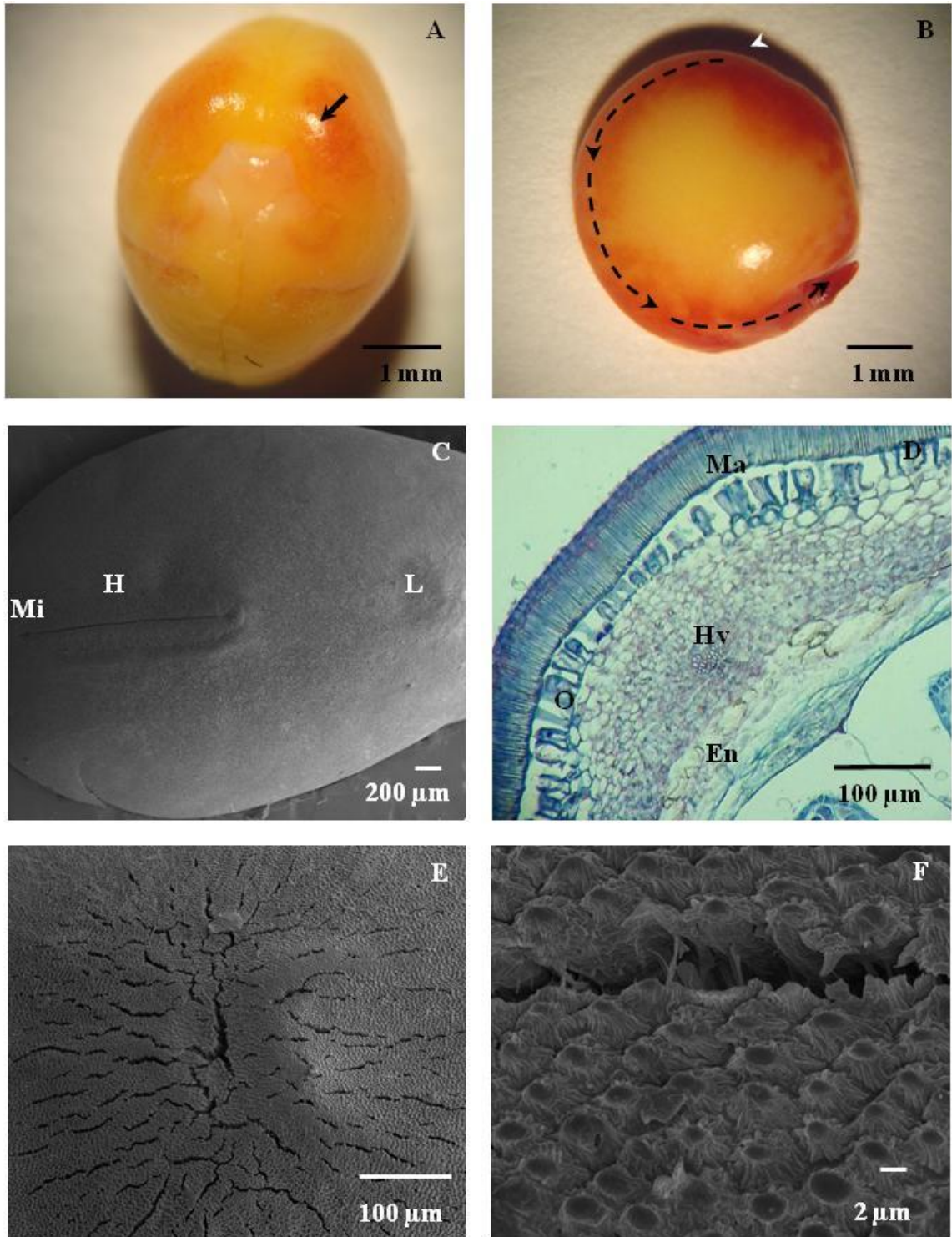


Figura 3.1. Zona inicial de entrada de agua, frente de mojado y grietas en la lente. A, coloración en la zona en contacto con la lente; B, avance del frente de mojado en línea de puntos; C, vista de hilo y lente (MEB); D, corte transversal de la lente (MO); E y F, detalle de grietas en la lente (MEB). En, endosperma; flecha, zona de la lente; H, hilo; Hv, haz vascular; L, lente; Ma, macrosclereidas; Mi, micrópilo; O, osteosclereidas.

y por Galussi (2011) en las semillas permeables de “alfalfa”, respecto a la presencia de poros en la cubierta seminal y su relación con la entrada de agua en la imbibición.

Las grandes columnas de osteoescleroidas, junto con el parénquima que acompaña a la barra de traqueidas, facilitan el movimiento del vapor de agua vía apoplástica hacia el exterior durante la deshidratación de la semilla. También facilitan la circulación del agua durante la imbibición hacia el MAR (meristema apical radical), los cotiledones, y el MAC (meristema apical caulinar).

Patrón de absorción

El patrón de absorción de agua en función del tiempo, evaluado en gramos de agua incorporados por gramo de peso fresco (PF), para el control (0 MPa) y los potenciales -0,3; -0,6 ; -0,8; -1 y -1,2 MPa, en condiciones de estrés hídrico (PEG) y salino (cloruro de sodio), se muestra en la figura 3.2. Durante los primeros días los patrones no varían significativamente entre los tratamientos y a partir del cuarto día las curvas se diferencian. Si bien la fase I de imbibición queda claramente delimitada, no ocurre lo mismo con la fase II, ya que no se observa la meseta correspondiente a la activación metabólica. La absorción de un 125% de agua (1250 g de agua por Kg de semilla) produce el paso a la fase III, esto es, la emergencia y el crecimiento de la radícula (germinación *sensu stricto*), y por lo tanto, determina el nivel mínimo de hidratación (NMH). Estos datos concuerdan con los citados para otras especies de Fabáceas como el “garbanzo”, la “arveja” (Hadas y Russo, 1974), y el “lupino blanco” y “lupino de hoja angosta” (Perissé y Planchuelo, 2004).

Estos resultados muestran que a igualdad de potencial, la tasa de absorción de agua es más lenta para los tratamientos de estrés hídrico que para los de estrés salino. Por ejemplo, de los correspondientes gráficos se observa que para $\Psi_a = -0,6$ MPa en condiciones de estrés hídrico, el NMH se alcanza a los 18 días, mientras que para el mismo potencial en condiciones de estrés salino, dicho nivel se logra a los 14 días. Para los otros potenciales se observa la misma tendencia. Las diferentes pendientes de las curvas de absorción para los distintos tratamientos muestran, como lo señalan Bewley y Black (1994)

y Bradford (1995), que la fuerza directriz del agua en la imbibición depende del gradiente de potencial agua entre la semilla y el medio.

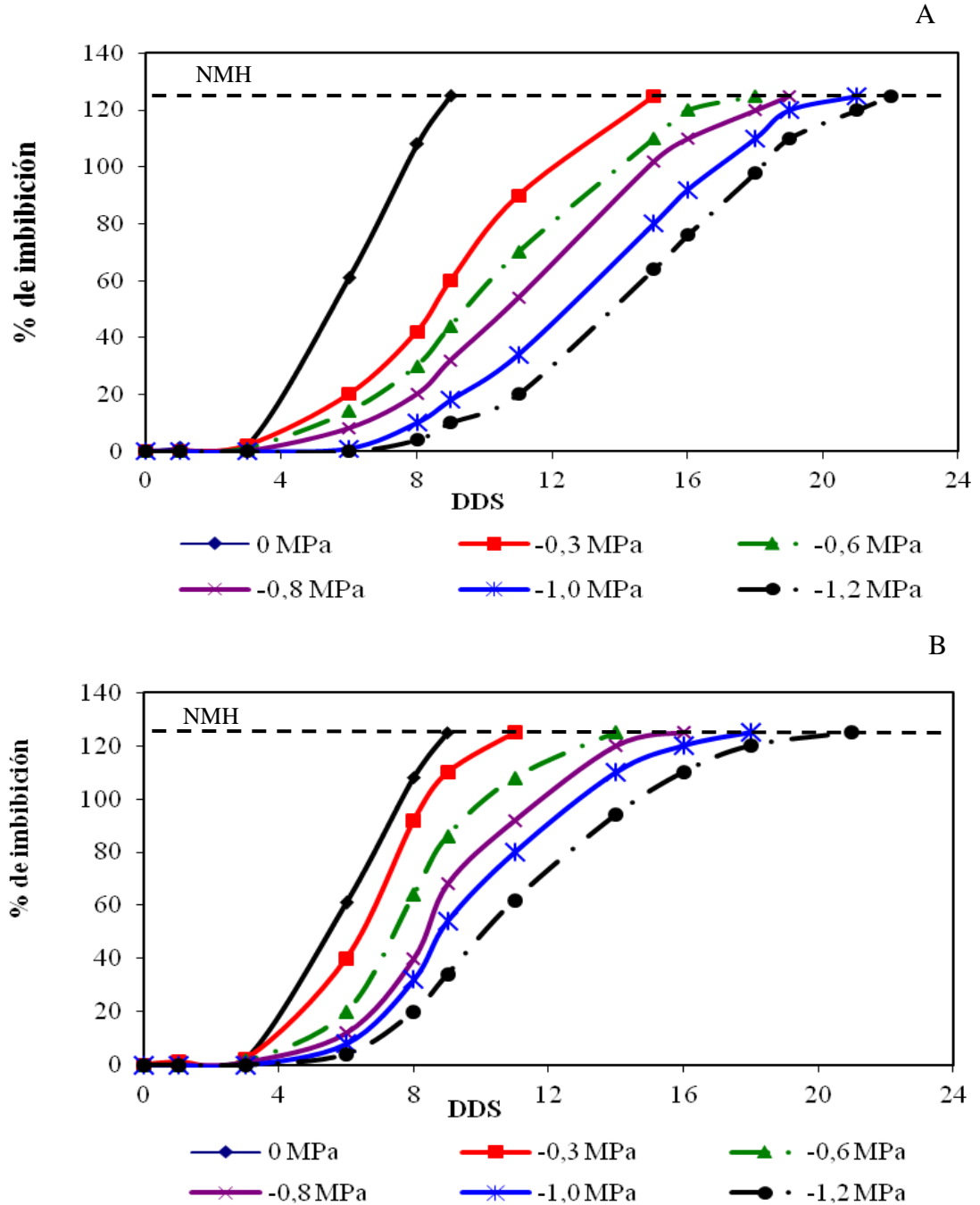


Figura 3.2. Patrón de absorción de agua para semillas de *V. dasycarpa* que germinan en distintas condiciones de potencial agua. A, estrés hídrico (PEG); B, salino (ClNa). DDS, días después de la siembra; $\Psi_a = 0$ MPa, control; NMH, nivel mínimo de hidratación.

CONCLUSIONES

Los resultados experimentales permiten afirmar que la entrada inicial de agua en la imbibición se produce por las grietas que presenta la lente, y que el frente de mojado avanza en el plano sagital siguiendo la línea del antirrafe. Estos resultados pueden explicar la hidratación completa del embrión y de la cubierta seminal. Los cotiledones aportan las reservas necesarias para entrar en la fase II de actividad metabólica. Cuando el contenido de agua del embrión supera el nivel mínimo de hidratación (NMH), la radícula inicia la elongación celular, y con ella se ejerce la presión necesaria para que el meristema apical radical (MAR) atraviese la cubierta seminal dando inicio a la fase III (germinación *sensu stricto*), y prosiguiendo el crecimiento en la fase heterótrofa. Los resultados revelan una mejor respuesta al estrés salino (ClNa) que al estrés hídrico (PEG).

EVALUACIÓN DE LA GERMINACIÓN DE *Vicia dasycarpa* cv. Tolse F.C.A. EN CONDICIONES DE ESTRÉS HÍDRICO Y SALINO

INTRODUCCIÓN

La disponibilidad de agua y la temperatura de la cama de siembra son los principales factores ambientales que afectan la germinación de las semillas y el posterior establecimiento de las plántulas (Berkart y Briske, 1982). Además, la etapa de la germinación es de primordial importancia ya que influye directamente durante el ciclo de crecimiento, determinando el éxito en el establecimiento y el rendimiento del cultivo (Hadas, 1976).

La gran variación en la emergencia de un mismo lote de semillas sembrado en distintos sitios demuestra que existe una gran sensibilidad a la humedad disponible en el suelo (Heydecker, 1969). Aún en semillas colocadas en un suelo con una adecuada disponibilidad de agua, con valores de potencial entre 0 y -0,03 MPa, existe una dispersión entre la primera y la última semilla que completa la germinación, dado que no todas germinan simultáneamente. Esta dispersión en el tiempo es un indicador de la uniformidad de la población de las semillas y un índice importante de la calidad del lote (Bradford, 1995). Por otro lado, puede ocurrir que la siembra a campo se realice bajo condiciones subóptimas de disponibilidad de agua, lo que redundará en una importante pérdida por mala implantación del cultivo.

El estrés por sequía afecta el crecimiento, la producción de materia seca y el rendimiento en un gran número de especies de plantas, pero la tolerancia de cualquier especie a esta amenaza varía notablemente (Jaleel *et al.*, 2009).

En los estudios de laboratorio, el estrés hídrico se puede simular mediante el uso de osmolitos con potenciales osmóticos decrecientes (Hadas, 1977; Lafond y Baker, 1986; Emmerich y Hardegree, 1991). Según Argüello *et al.* (1992) el polietilenglicol (PEG) resulta

un osmolito adecuado para discriminar líneas de maní susceptibles y tolerantes a la sequía, siendo el porcentaje de germinación la variable más sensible. Para simular el estrés salino resulta apropiado el cloruro de sodio, ya que esta sal es la más común de observar en suelos con esta problemática (Munns y Tester, 2008). Por otra parte, Murillo *et al.* (2002) señalaron que el estrés hídrico simulado con PEG, tuvo un efecto negativo mayor en la germinación de *Vigna unguiculata* L. Walp. que el salino simulado con cloruro de sodio.

Como se mencionó en el Capítulo 1, el concepto de tiempo hídrico es un modelo unificador para describir los patrones de germinación que se producen en respuesta al potencial agua Ψ_a (Bradford y Still, 2004). El análisis de tiempo hídrico puede proporcionar varios índices de calidad de las semillas relacionados con la tolerancia al estrés, la velocidad y la uniformidad de la germinación, como así también del potencial agua mínimo que permite obtener un porcentaje de germinación especificado, denominado potencial base $\Psi_B(p)$ (Kent *et al.*, 2004; Bradford y Still, 2004). La comparación entre los resultados experimentales y los modelizados suministra información acerca de la bondad del ajuste, necesaria para establecer el grado de confiabilidad y precisión de las predicciones del modelo, al efectuar estimaciones para otros casos no contemplados en el estudio experimental realizado. Si bien son varios los estudios llevados a cabo para evaluar el comportamiento de distintas especies bajo deficiencia hídrica simulada con PEG, como en “tomate” (Bhatt y Srinivasa Rao, 1987), “Bignonia amarilla” *Tecoma stans* (L.) Juss. ex Kunth (Cordero y Distéfano, 1990), “poroto” (De y Kar, 1995), “arroz” (Perez- Molphe-Balch *et al.* 1996), “lupino blanco” y “lupino de hoja angosta” (Perissé *et al.*, 2002), excepto por el estudio de cuatro especies de “vicias alpinas” que crecen en las praderas de China (Wang, 2013) y tres que crecen en las regiones semiáridas de Túnez (Haffani *et al.*, 2014), no hay antecedentes de investigaciones con esta metodología para el cultivar Tulse F.C.A. de *Vicia dasycarpa*. Por otro lado, entre los antecedentes en relación con la germinación de leguminosas en condiciones de estrés salino se encuentran los correspondientes a *Lotus tenuis* (Pesqueira *et al.*, 2007); *Prosopis strombulifera* (Reginato, 2009) y *Phaseolus vulgaris* (Pessaraki, 2011).

La temperatura óptima de germinación para *Vicia* spp. es de 20 °C (ISTA, 2004). El conocimiento de la respuesta a la germinación en condiciones limitantes de disponibilidad de agua y la salinidad, permitirá la toma de decisiones en relación a la selección de las especies,

variedades y fechas de siembra más apropiadas. Por otro lado, Sharma (1973) sostiene que es necesario el conocimiento del comportamiento específico y varietal para establecer las condiciones óptimas y no considera factible realizar extrapolaciones a partir del comportamiento de especies afines.

Con esta premisa y con la finalidad de seleccionar especies y cultivares para un ambiente donde el estrés hídrico y salino se produce al comienzo del ciclo, se consideran de importancia los estudios sobre este cultivar obtenido en la Facultad de Ciencias Agropecuarias, con promisorias posibilidades de implantación en zonas marginales de nuestro país.

En base a los antecedentes se formula la siguiente hipótesis:

Vicia dasycarpa cv. Tolse F.C.A. tiene mejor respuesta al estrés salino que al hídrico, ya que alcanza antes el nivel mínimo de hidratación. La determinación de los parámetros de tiempo hídrico permite explicar esta mejor respuesta.

Los objetivos de este capítulo fueron evaluar la germinación del cultivar Tolse FCA de *Vicia dasycarpa* en condiciones de estrés hídrico y salino, determinar los parámetros de tiempo hídrico, y evaluar la recuperación de las semillas no germinadas.

MATERIALES Y MÉTODOS

Ensayos de germinación

Las pruebas de germinación se llevaron a cabo según normas ISTA, con los tratamientos descritos en el Capítulo 3 ($\Psi_a = 0$ MPa para el control, y -0,3; -0,6; -0,8; -1 y -1,2 MPa obtenidos con las soluciones de PEG y las correspondientes de cloruro de sodio). Se realizaron cuatro repeticiones de 25 semillas por tratamiento, siguiendo un diseño en bloques completamente aleatorizados. Se efectuaron recuentos diarios del número de semillas germinadas a partir de su introducción en la cámara de germinación, hasta el décimo quinto día, en el cual se dio por finalizado el ensayo. Se consideró semilla germinada aquella que

presentó 2 mm de radícula a través de la cubierta seminal (Hadas y Russo, 1974). La germinación completa se definió como el máximo porcentaje de germinación obtenido en el tratamiento control (Hadas, 1977).

Se evaluaron las siguientes variables:

- Porcentaje de germinación.
- Número de días para alcanzar el 50% de germinación (G_{50}).
- Parámetros de tiempo hídrico.
- Porcentaje de semillas recuperadas.

El análisis estadístico se realizó mediante el programa InfoStat (2009), los datos se analizaron mediante ANOVA, y se aplicaron las pruebas de Duncan y LSD ($p < 0,05$) para la comparación de medias.

Determinación de los parámetros de tiempo hídrico

El tiempo hídrico es un concepto propuesto por Bradford (1995) para estimar el tiempo necesario para alcanzar un porcentaje de germinación (p) a un determinado potencial agua (Ψ_a), en base a resultados obtenidos en ensayos realizados a diferentes potenciales. De este modo, se pueden hacer predicciones preliminares orientadoras para otros potenciales, sin necesidad de realizar ensayos específicos.

El modelo establece que el tiempo $tg(p)$ necesario para obtener un porcentaje de germinación p a un potencial agua Ψ_a , es inversamente proporcional a la diferencia entre el potencial agua considerado y un potencial base $\Psi_B(p)$, por debajo del cual no es posible alcanzar el porcentaje de germinación estipulado p . Matemáticamente

$$tg(p) = \frac{\theta_H}{\Psi_a - \Psi_B(p)} \quad (4.1)$$

De esta ecuación surge que para $\Psi_a = \Psi_B(p)$ el tiempo $tg(p)$ tiende a infinito, o sea que no hay germinación. Los coeficientes θ_H y $\Psi_B(p)$ se determinan experimentalmente por medio de ensayos a diferentes potenciales, de la siguiente manera:

Se define una función $G(p)$ como la inversa de $tg(p)$, esto es:

$$G(p) = \frac{1}{tg(p)} = \frac{\Psi_a - \Psi_B(p)}{\theta_H} = \frac{1}{\theta_H} \Psi_a - \frac{\Psi_B(p)}{\theta_H} \quad (4.2)$$

que es la ecuación de una recta del tipo

$$G(p) = a \Psi_a + b \quad (4.3)$$

donde

$$a = \frac{1}{\theta_H} \quad \text{y} \quad b = -\frac{\Psi_B(p)}{\theta_H} \quad (4.4)$$

De acuerdo con el modelo de Bradford, el coeficiente a es el mismo para todos los porcentajes p y potenciales Ψ_a , mientras que el coeficiente b depende del porcentaje de germinación especificado para cada potencial. Para determinar estos coeficientes se hacen ensayos de germinación a diferentes potenciales agua. Supóngase que se obtuvieron los resultados que se muestran en la figura 4.1.

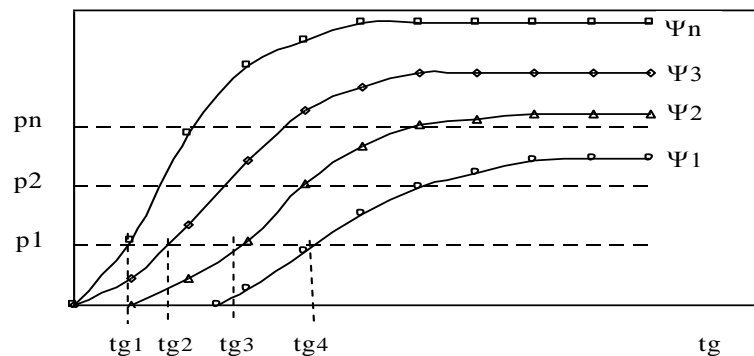


Figura 4.1. Gráfico ilustrativo para el cálculo del tiempo hídrico.

Se estipulan varios porcentajes de germinación para los cálculos, denominados p_1 , p_2 , ... p_n en el gráfico. Para cada porcentaje se obtienen diferentes tiempos de germinación en función del potencial agua. Por ejemplo, para el porcentaje p_1 se tienen 4 tiempos (tg_1 , tg_2 , tg_3 y tg_4), para los potenciales Ψ_{a1} , Ψ_{a2} , Ψ_{a3} y Ψ_{a4} , respectivamente. Para los otros

porcentajes se obtienen de la misma manera los tiempos correspondientes para cada potencial.

Por lo tanto, para cada porcentaje p se puede plantear una ecuación similar a la (4.3):

$$\begin{aligned} G(p_1) &= a\Psi_a + b_1 \\ G(p_2) &= a\Psi_a + b_2 \\ G(p_n) &= a\Psi_a + b_n \end{aligned} \quad (4.5)$$

Los coeficientes a y b_1, b_2, \dots, b_n se calculan por medio del siguiente sistema de ecuaciones obtenidas por mínimos cuadrados

$$a = \frac{\sum_{i=1}^{n_p} \sum_{j=1}^{n_i} [\Psi_{aj} G_j(p_i)] - \sum_{i=1}^{n_p} \frac{\sum_{j=1}^{n_i} \Psi_{aj} \sum_{j=1}^{n_i} G_j(p_i)}{n_i}}{\sum_{i=1}^{n_p} \sum_{j=1}^{n_i} \Psi_{aj}^2 - \sum_{i=1}^{n_p} \frac{\sum_{j=1}^{n_i} (\Psi_{aj})^2}{n_i}} \quad (4.6)$$

$$b_i = \frac{\sum_{j=1}^{n_i} G_j(p_i) - a \sum_{j=1}^{n_i} \Psi_{aj}}{n_i}$$

donde n_p es el número de porcentajes utilizados para los cálculos, y n_i el número de potenciales agua para cada porcentaje i .

Una vez obtenidos los coeficientes a y b_i , se determinan con las ecuaciones (4.4) los valores de θ_H y $\Psi_B(p_i)$:

$$\begin{aligned}\theta_H &= \frac{1}{a} \\ \Psi_B(p_i) &= -\frac{b_i}{a}\end{aligned}\tag{4.8}$$

Relación entre potenciales base y porcentajes de germinación

Se determinó por medio del análisis probit, y se compararon los resultados con los obtenidos con el modelo de tiempo hídrico. Asumiendo que el potencial agua base $\Psi_B(p)$ tiene una distribución normal, con media $\Psi_B(50)$ y desviación estándar σ_{Ψ_B} , el probit está dado por:

$$\text{probit}(p) = \frac{\Psi_a - \theta_H/tg(p) - \Psi_B(50)}{\sigma_{\Psi_B}}\tag{4.9}$$

que se puede expresar como

$$\text{probit}(p) = \frac{1}{\sigma_{\Psi_B}} [\Psi_a - \theta_H/tg(p)] - \frac{\Psi_B(50)}{\sigma_{\Psi_B}}\tag{4.10}$$

que es la ecuación de una recta de variable $\Psi_a - \theta_H/tg(p)$, con pendiente $1/\sigma_{\Psi_B}$ y ordenada al origen $-\Psi_B(50)/\sigma_{\Psi_B}$. Se calcula el probit en función de $\Psi_a - \theta_H/tg(p)$ iterativamente, variando el valor de θ_H hasta que resulte la mejor regresión, de la que se obtienen la pendiente y la ordenada al origen. La inversa de la pendiente es la desviación estándar σ_{Ψ_B} , y el valor de $\Psi_B(50)$ es la ordenada al origen multiplicada por σ_{Ψ_B} y cambiada de signo. De la ecuación anterior se desprende que para un potencial $\Psi_a = \Psi_B(50)$ (potencial para obtener un 50% de germinación en un tiempo infinito) resulta el probit igual a cero. Por lo tanto, la recta representada por esa ecuación corta al eje de abscisas en el potencial base $\Psi_B(50)$.

Ensayos de recuperación

Se realizaron pruebas de recuperación en aquellas semillas no germinadas luego de finalizado el ensayo (15 días), para indagar la potencialidad de recuperación. Las semillas no germinadas de cada tratamiento se lavaron con agua destilada, se secaron con papel de germinación y se ubicaron en cajas de germinación, en cuya base se colocó papel de germinación esterilizado embebido en agua destilada, se taparon y colocaron en bolsas plásticas. Luego se llevaron a la cámara de germinación en condiciones óptimas (20 °C y 8/16 horas de luz/oscuridad). A los 7 días se registró el número de semillas germinadas, denominándolas “semillas recuperadas” y se determinó su porcentaje (Ungar, 1996).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Evaluación de la germinación en distintas condiciones de potencial agua que simulan estrés hídrico y salino

Los resultados muestran que la germinación completa para el tratamiento control (99%), se alcanzó a los 12 días después de la siembra. Para los tratamientos que simularon estrés hídrico con PEG se superó el G_{50} con potenciales agua de hasta -0,8 MPa. En los que simularon estrés salino con cloruro de sodio el G_{50} se superó con potenciales de hasta -1MPa (Fig. 4.2). Los resultados de germinación del testigo tal como lo señala Bradford (1995), resultaron un buen indicador de la uniformidad y por lo tanto de la calidad de la muestra. En este caso a los 2 días germinó aproximadamente el 40 % de las semillas del cultivar de *V. dasycarpa*, y a los 4 días se produjo el 90% de germinación. Las diferencias en los porcentajes de germinación en función del tiempo puestas de manifiesto en los distintos tratamientos de estrés hídrico, son concordantes con las señaladas para otras especies como en “tomate” (Bhatt y Srinivasa Rao, 1987), “arroz” (Pérez- Molphe-Balch *et al.* 1996), o entre las leguminosas “poroto” (De y Kar, 1995), “lupino blanco” y “lupino de hoja angosta” (Perissé *et al.*, 2002), que demostraron que el estrés hídrico disminuyó el porcentaje de germinación. A partir de los gráficos, se puede estimar que con un potencial de -0,8 MPa para los tratamientos de estrés hídrico (PEG) y salino (cloruro de sodio), el G_{50} se alcanza a los 10 y 3 días después de la siembra respectivamente. Estos resultados concuerdan con los

señalados por Murillo *et al.*, (2002) para *V. unguiculata*, en los cuales a igualdad de potenciales osmóticos simulados con PEG y cloruro de sodio, la germinación fue menos afectada en los tratamientos con este último osmolito.

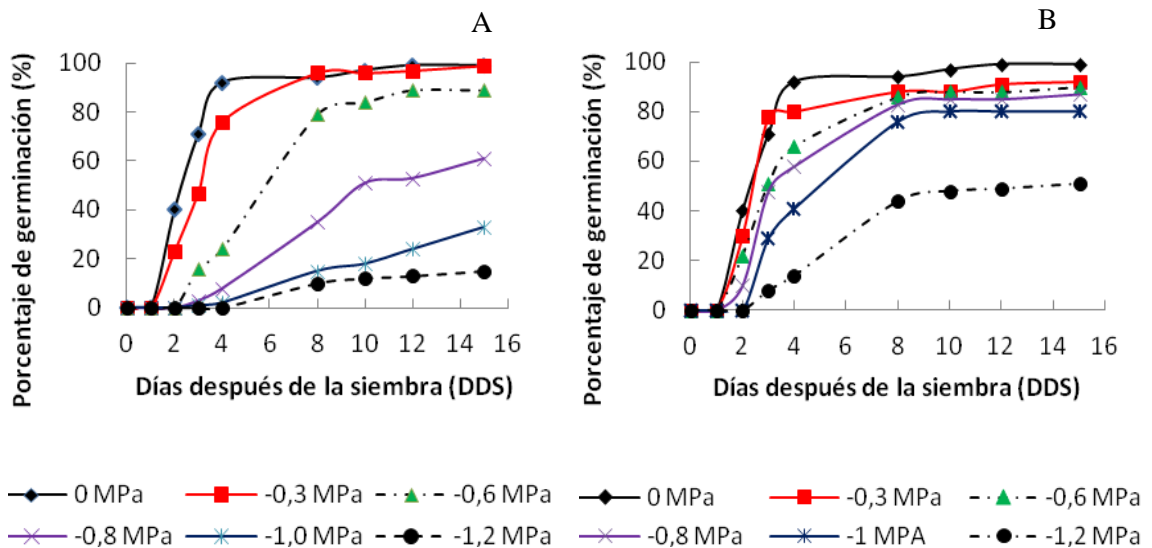


Figura 4.2. Evaluación de la germinación de *V. dasycarpa* en distintas condiciones de potencial agua. A, PEG; B, ClNa; 0 MPa, control.

La figura 4.3 muestra la comparación entre los resultados experimentales y los obtenidos con el modelo de tiempo hídrico. Se observa para los tratamientos con PEG una buena correspondencia cualitativa y cuantitativa entre ambos, excepto para el tratamiento de -0,6 MPa, donde la diferencia es del orden del 25%, subestimando el modelo a los resultados experimentales. Para los tratamientos con cloruro de sodio los resultados del modelo presentan diferencias máximas inferiores al 10% con respecto a los experimentales.

Las diferencias en relación al tiempo para alcanzar el G_{50} entre los tratamientos con PEG y cloruro de sodio, se pueden explicar en función de los patrones de absorción de agua, donde a igualdad de potencial, la tasa de absorción es más lenta para los tratamientos de estrés hídrico que para los de estrés salino. Por lo tanto, con estos últimos se alcanza en menor tiempo el NMH, lo que desencadena el inicio de la fase III (la germinación *sensu stricto*). En concordancia con Argüello *et al.* (1992), el polietilenglicol resulta un osmolito eficiente para simular estrés hídrico en los estudios de germinación.

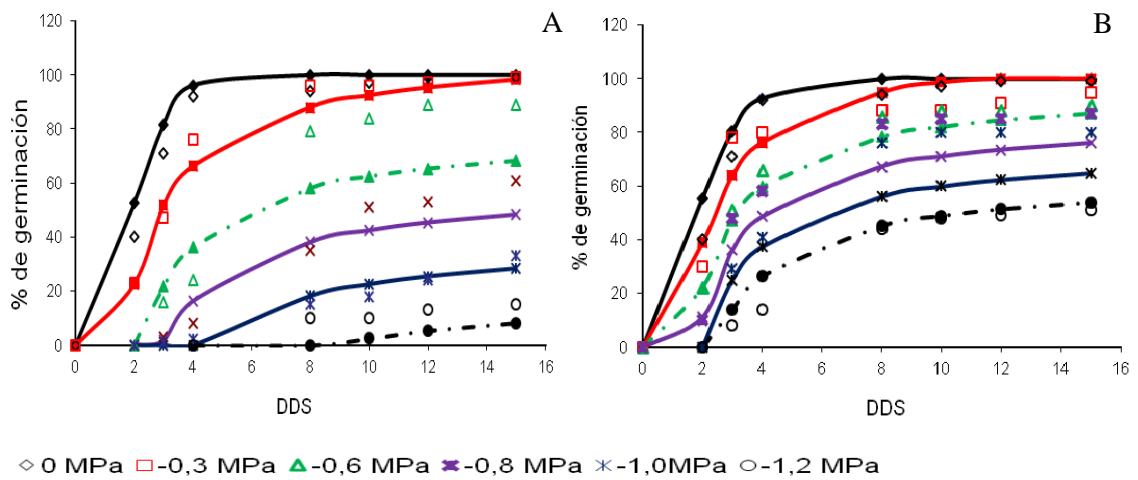


Figura 4.3. Comparación entre los resultados experimentales y los modelizados con el tiempo hídrico. A, PEG; B, ClNa. Línea continua, resultados modelizados; marcadores sin línea, datos experimentales; 0 MPa, control; DDS, días después de la siembra.

Parámetros de tiempo hídrico

Según los resultados de la aplicación del modelo del tiempo hídrico para los casos considerados (PEG y cloruro de sodio), se obtuvo que para alcanzar el 50 % de germinación en condiciones de estrés hídrico, el potencial base (el mínimo potencial al cual se obtiene dicho porcentaje de germinación) es de aproximadamente -0,9 MPa. Aún más, con un potencial base de -0,5 MPa se lograría un 90% de germinación. Por otro lado, para el caso de estrés salino el modelo predice que el 50% de germinación se lograría con un potencial base de -1,4 MPa (Fig. 4.4).

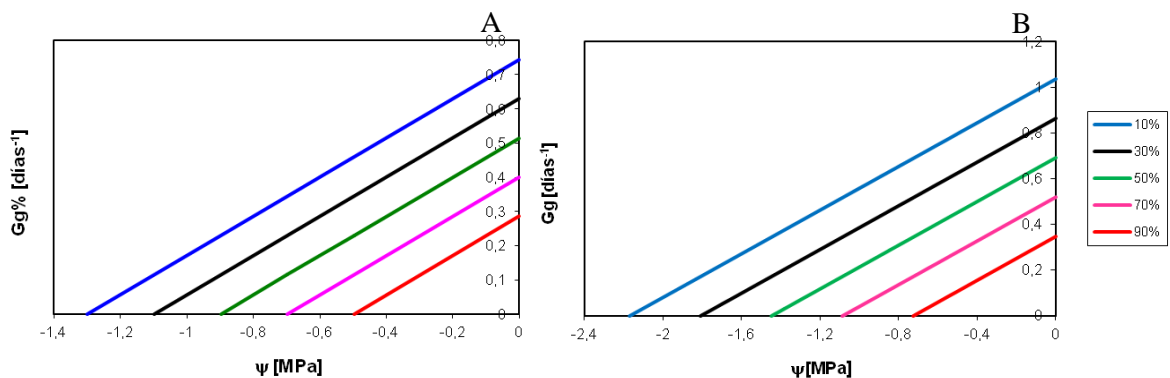


Figura 4.4. Modelo de tiempo hídrico para la germinación de *V. dasycarpa* en distintas condiciones de potencial agua. A, Potenciales de base para PEG; B, Potenciales de base para ClNa.

Relación entre potenciales base y porcentajes de germinación

La relación entre los potenciales base y los porcentajes de germinación se obtuvieron a partir de los parámetros de tiempo hídrico mostrados en la figura 4.4 del punto anterior. Para fin se procedió como se indica a continuación.

Con los datos de la figura 4.4 se representaron el porcentaje de germinación en función del potencial base (potencial correspondiente a $G_g = 0$ para cada porcentaje considerado). De esta manera se confeccionaron los gráficos de la figura 4.5.

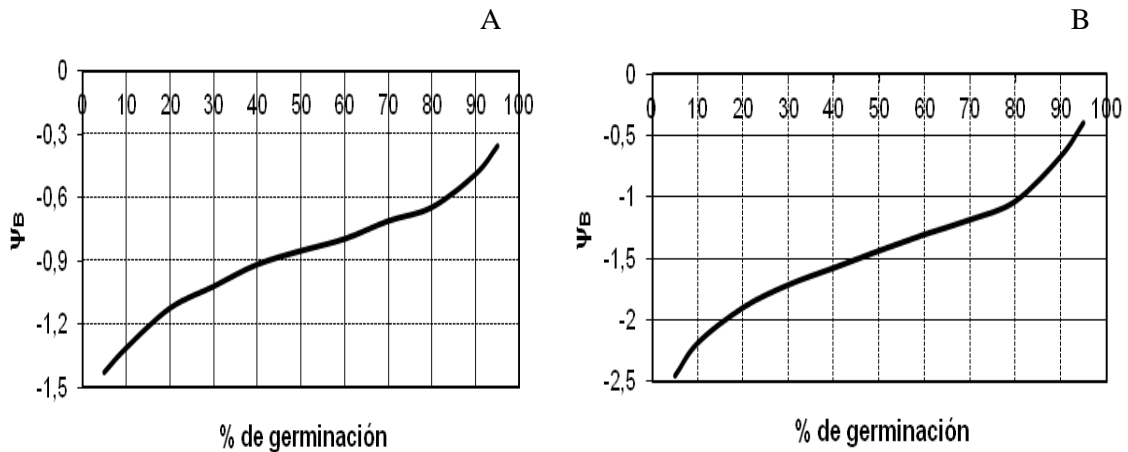


Figura 4.5. Relación entre potenciales base y porcentajes de germinación. A, Ψ_B PEG; B, Ψ_B ClNa.

Por medio de los respectivos gráficos se pueden estimar los porcentajes de germinación que se obtendrían en condiciones de estrés hídrico (PEG) y salino (cloruro de sodio), para un determinado potencial base. Por ejemplo, para el caso de estrés hídrico, con un potencial base de -0,6 MPa el porcentaje de germinación sería de alrededor del el 80%, mientras que para condiciones de estrés salino, el mismo porcentaje se alcanzaría con un potencial base de -1 MPa.

Análisis probit para la determinación de los parámetros de tiempo hídrico

En la figura 4.6 se muestran los resultados obtenidos con el análisis probit:

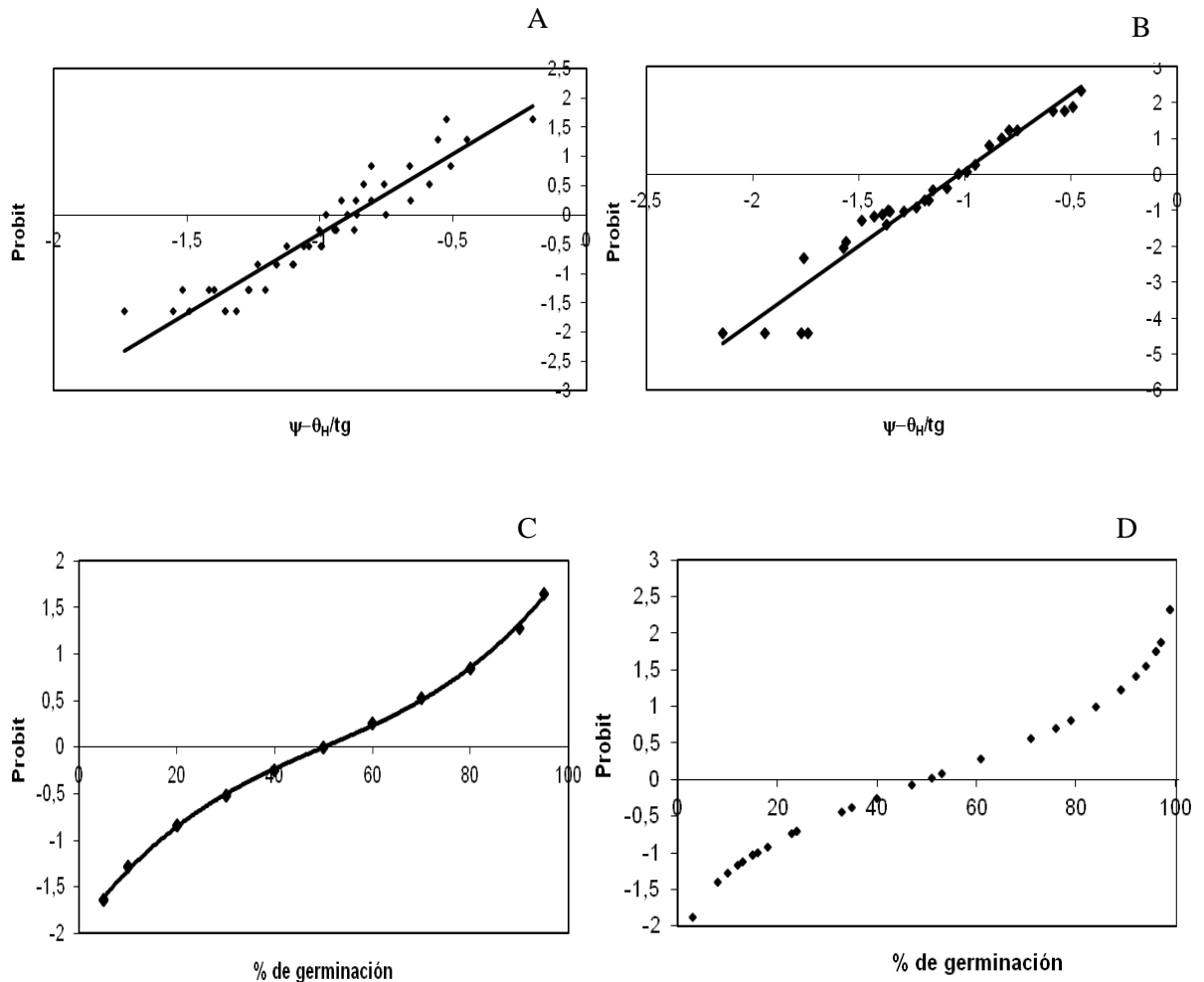


Figura 4.6. Análisis probit de correlación para los distintos niveles de potencial agua con PEG. A, probit ; B, con todos los datos; C, probit para el porcentaje de germinación ; D, probit, con todos los datos.

La figura 4.6 A corresponde al probit realizado con los porcentajes de germinación considerados para el cálculo del tiempo hídrico. La recta de regresión corta al eje de abscisas en aproximadamente $-0,9$ MPa, valor correspondiente al Ψ_B para el 50% de germinación. La figura 4.6 B corresponde al probit realizado con todos los datos provenientes de los ensayos. El valor Ψ_B (50) es aproximadamente el mismo que el anterior.

En las figuras 4.7 C y D se observa que la función corta al eje de abscisas en el 50% de germinación, en correspondencia con el potencial de base para ese porcentaje. Para los ensayos de estrés salino, en las figuras 4.7 A y B la recta de regresión corta al eje de abscisas en aproximadamente -1,6 MPa, correspondiente a Ψ_B (50), y en las figuras 4.6 C y D se observa que ese punto corresponde al 50% de germinación.

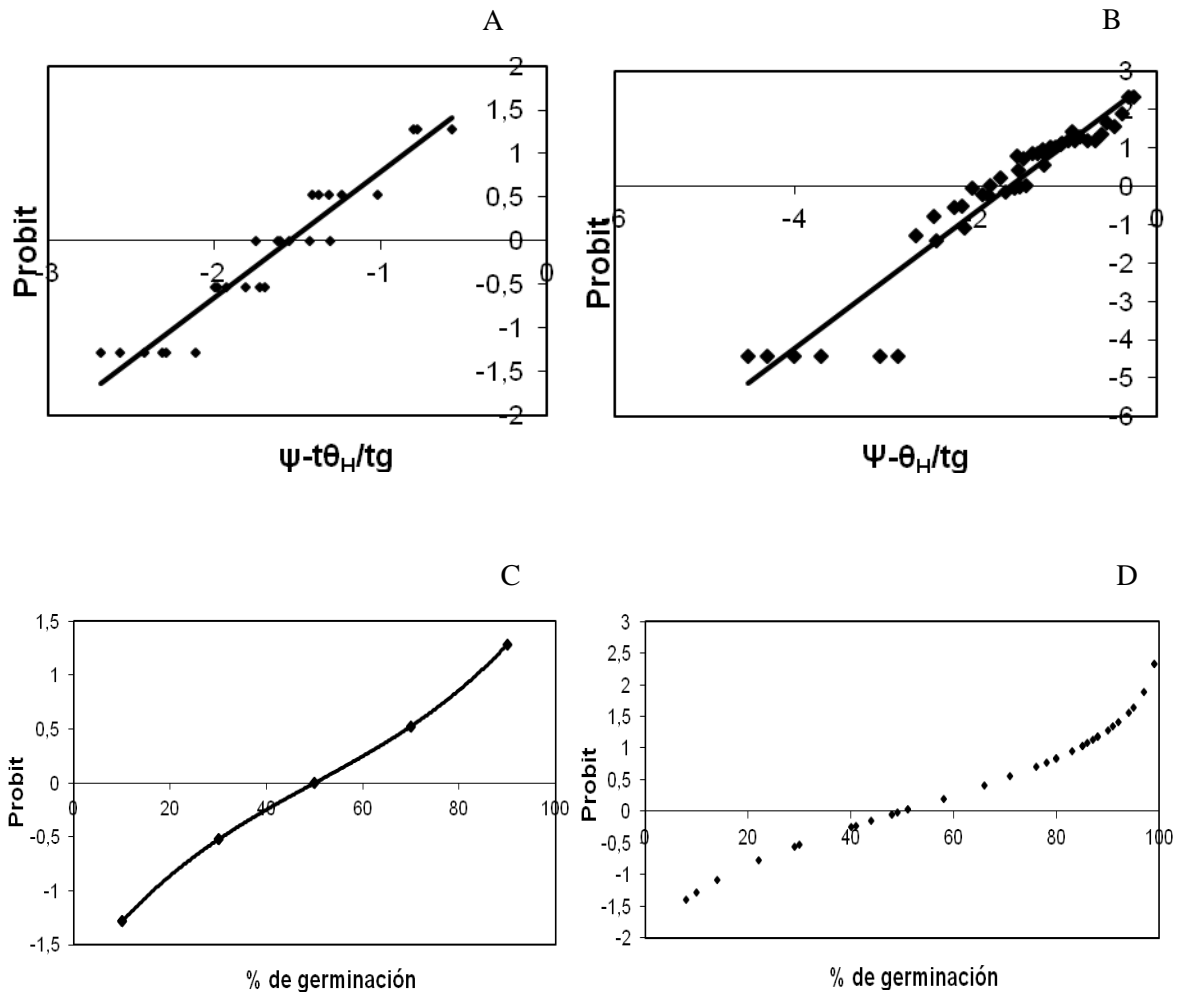


Figura 4.7. Análisis probit de correlación para los distintos niveles de potencial agua con ClNa. A, probit; B, con todos los datos; C, probit para el porcentaje de germinación; D, probit, con todos los datos.

Los resultados son consistentes con los señalados por Wang (2013), ya que potenciales equivalentes a -1,29; -1,3; -1,29; y -1,36 MPa, resultaron ser críticos para *Vicia angustifolia* L., *V. amoena* Fisch. ex Ser., *V. unijuga* A. Braun y *V. sativa* L., respectivamente. Por otro lado, el valor de $\theta_H = 1,6$ calculado para *V. dasycarpa* es similar al de *V. amoena* ($\theta_H = 1,3$) e inferior a los correspondientes a *V. angustifolia* ($\theta_H = 3,3$), *V. unijuga* ($\theta_H = 4,3$) y *V. sativa* ($\theta_H = 3,8$).

Por otra parte, según Haffani *et al.* (2014) la respuesta de *V. villosa* fue una menor eficiencia en el uso del agua y baja adaptación al estrés hídrico, en comparación con *V. narbonensis* L., que mostró el valor más alto de tolerancia al estrés. Sin embargo, cabe señalar que estos últimos estudios se realizaron en invernáculo, y los tratamientos de estrés hídrico se iniciaron a los 30 días después de la siembra.

Síntesis de resultados

Tabla 4.1. Porcentajes finales de germinación para *V. dasycarpa* en distintas condiciones de potencial agua simulados con PEG y con CINa.

Ψ agua MPa	PEG	CINa
0,0 (control)	99 a	99 a
-0,3	99 a	95 ab
-0,6	89 b	90 bc
-0,8	61 c	87 c
-1	33 d	80 d
-1,2	15 e	51 e

Cada valor representa la media de 4 repeticiones de 25 semillas cada una. Valores medios seguidos de letras iguales en la misma columna no difieren significativamente ($p < 0,05$).

Tabla 4.2. Comparación de los resultados obtenidos por medio de los distintos modelos.

	Tiempo hídrico		Probit		Probit general		Valores medios	
	PEG	CINa	PEG	CINa	PEG	CINa	PEG	CINa
θ_H	1,670	2,66	1,746	3,038	2,283	3,719	1,90 ±0,27	3,14±0,44
$\Psi_{B(50)}$	-0,852	-1,433	-0,897	-1,568	-1,00	-1,626	0,92±0,06	1,54±0,08
σ_{Ψ_B}	0,317	0,591	0,331	0,654	0,266	0,514	0,30±0,03	0,59±0,06

Ensayos de recuperación

Tabla 4.3. Porcentaje de semillas recuperadas de *V. dasycarpa* luego de 7 días de transferidas a condiciones de estándares de germinación (agua destilada a 20°C)

Ψ_a MPa	PEG	CINa
	% semillas recuperadas	% de semillas recuperadas
-0,3	--	--
-0,6	100	--
-0,8	82	25
-1	92	10
-1,2	89	13

Los resultados de semillas recuperadas son consistentes con los señalados por Cordero y Di Stéfano (1991) para *Tecoma stans*, quienes reportaron una rápida respuesta y recuperación de semillas de esta especie sometidas a niveles de estrés hídrico inducido por PEG. Estos autores señalaron que las semillas recuperadas del tratamiento $\Psi_a = -1$ MPa, superaron los porcentajes de germinación del testigo. Los niveles altos de recuperación obtenidos en el cultivar Tolse F.C.A. de *V. dasycarpa* para los tratamientos de estrés hídrico, se pueden explicar teniendo en cuenta que el PEG podría ejercer un efecto osmoprotector en las semillas sometidas a este osmolito. Esto es, el sistema de membranas del embrión, que previo a la imbibición de las semillas se encuentra en fase gel, al embeber lentamente restablecerían su composición a la fase líquido cristalina, hasta completar la fase 1 del patrón de absorción de agua (Bewley y Black, 1994). Las membranas no

perderían su propiedad de permeabilidad, y se evitaría el período de transición con la característica pérdida de electrolitos. De esta forma se explicaría la recuperación y la rápida respuesta a la germinación al restablecerse las condiciones óptimas de disponibilidad de agua. Por otra parte, la ausencia del efecto osmoprotector en los tratamientos con cloruro de sodio explicaría el bajo porcentaje de recuperación. Como se demostró en el Capítulo 3, las semillas con estos últimos tratamientos se embeben más rápidamente. Así según Bewley y Black (1994), durante la transición de las membranas de la fase gel a líquido cristalino, se producirían pérdidas de electrolitos debido a la permeabilidad de las mismas.

Los bajos porcentajes de recuperación en los tratamientos más severos de estrés salino, expresan la alteración del equilibrio iónico y acuoso que genera un estrés hiperosmótico, desbalance iónico y toxicidad, que compromete la viabilidad de las semillas expuestas a altas concentraciones salinas.

CONCLUSIONES

Los resultados demuestran que el cultivar Tolse F.C.A. de *Vicia dasycarpa* tiene una respuesta superior al estrés salino simulado con cloruro de sodio que frente al estrés hídrico simulado con PEG. Asimismo, la respuesta frente al estrés hídrico moderado equivalente a $-0,6\text{MPa}$, sugiere una potencialidad promisoriosa para su uso como pastura o abono verde en campos marginales con este tipo de problemas. Aún más, resulta de fundamental importancia el alto porcentaje de recuperación, mayor al 80%, una vez superado el estrés hídrico (PEG) para un Ψ_a de $-0,8\text{ MPa}$. Por otro lado, el 25% de recuperación para el mismo potencial en estrés salino indicaría un daño significativo irreversible a nivel celular. Si bien de la comparación entre los resultados obtenidos con el modelo de tiempo hídrico y el probit surge una dispersión entre los valores de los parámetros obtenidos con cada uno de ellos, la desviación estándar correspondiente al promedio del potencial de base para el G_{50} es inferior al 7%. Por lo tanto, la aplicación del modelo de tiempo hídrico será de utilidad en los programas de mejoramiento y selección para identificar cultivares de *Vicia dasycarpa* que demuestren una mejor respuesta al estrés hídrico y salino.

RESPUESTAS MORFO-ANATÓMICAS EN PLÁNTULAS DESARROLLADAS EN CONDICIONES DE ESTRÉS HÍDRICO Y SALINO

INTRODUCCIÓN

El estrés es un estado fisiológico alterado causado por factores que tienden a romper el equilibrio (Jaleel *et al.*, 2009). El concepto de estrés fue desarrollado teniendo en cuenta dos objetivos: (1) distinguir entre los cambios homeostáticos de las plantas en respuesta a pequeñas fluctuaciones diarias del medio ambiente y las respuestas al estrés; y (2), para establecer una clara distinción entre el factor del estrés -señal externa- y las respuestas al estrés -los efectos y las restricciones inducidas por las condiciones estresantes a la planta- (Pedrol *et al.*, 2006).

Los factores de estrés que afectan los procesos fisiológicos de las plantas se pueden diferenciar en dos tipos: bióticos -agentes patógenos, competencia, alelopatía, actividad antrópica- y abióticos -temperatura, agua, radiación, químicos, viento presión- (Mano, 2002; Lichtenthaler, 2004; Landgridge *et al.*, 2006; Pedrol *et al.*, 2006; Ruiz, 2009).

La sequía es un término meteorológico, comúnmente definido como un período sin lluvias importantes. El estrés por sequía se produce cuando el agua disponible en el suelo es reducida, y las condiciones atmosféricas causan pérdida continua de agua por evapotranspiración (Jaleel *et al.*, 2009). De este modo, las plantas experimentan estrés hídrico cuando el suministro de agua a sus raíces es limitado. Se debe principalmente a un déficit causado por una sequía o por alta salinidad del suelo (Akinci y Lösel, 2012).

La disminución de potencial agua del suelo debido a la salinidad produce un efecto similar al del estrés hídrico por deficiencia de agua. La principal diferencia es que, mientras el bajo potencial agua por estrés hídrico mantiene una cantidad de agua finita en el perfil del

suelo (que causa una disminución en el potencial), en ambientes salinos la disponibilidad de agua es constante a bajo potencial agua (Taiz y Zeiger, 2010).

El proceso dinámico que implica la respuesta del vegetal al estrés reconoce una secuencia de tres fases: una inicial (de alarma), una de resistencia o aclimatación (cuando continúa el estrés), y la final o de agotamiento, que puede conducir a la muerte (Reigosa y Pedrol, 2004). Si el estrés finaliza antes que dominen los procesos de senescencia, las plantas se recuperan y evolucionan hacia un nuevo estatus fisiológico (Reigosa y Pedrol, 2004). La adaptación a un ambiente estresante involucra eventos integrados que se traducen en cambios a todos los niveles: morfológico, anatómico, celular, bioquímico y molecular (Taiz y Zeiger, 2010), que evitan que las plantas alcancen su máximo potencial genético y limitan la productividad del cultivo (Procházková y Wilhlemová, 2011).

El estrés por déficit hídrico es considerado uno de los más relevantes tanto a nivel ecológico como agronómico, y es claro que restringe la distribución geográfica y el rendimiento de la mayoría de los cultivos (Golberg *et al.*, 2011). Al comienzo del ciclo, el estrés hídrico afecta en gran medida la germinación, retrasa la emergencia, afecta el crecimiento de las plantas jóvenes; se manifiesta en una baja densidad de individuos a campo, una disminución en la acumulación de materia seca, y finalmente en el rendimiento cosechable (Li *et al.*, 2013). Sin embargo, la intensidad de la respuesta y los efectos del estrés dependen de la especie considerada (Jaleel *et al.*, 2009).

El concepto “estrés” se encuentra íntimamente asociado con el de “tolerancia al estrés”. Si bien Levitt (1980), Turner (1986) y Larcher (2003), entre otros, emplean este último término como sinónimo de “resistencia al estrés”; según Taiz y Zeiger (2010) se prefiere el término **tolerancia al estrés** como referencia a la aptitud de la planta para hacer frente a un ambiente desfavorable.

Resulta dificultoso definir la “tolerancia a la sequía”. Sin embargo Jones (1993) señala que los genotipos tolerantes a la sequía de la mayoría de las plantas cultivadas, son los que dan algún rendimiento en un entorno limitado de agua. Se han realizado diversos intentos de clasificación de los tipos de plantas que crecen en regiones secas, distinguiendo tres tipos

principales de plantas xerófitas: las que “escapan a la sequía”, las que “evaden o evitan”, y las que “soportan o toleran la sequía” (Fahn y Cutler, 1992).

Una de las ventajas de agrupar las especies según su comportamiento ecológico o fisiológico, es que se alcanza un nivel predictivo significativamente mayor sobre los posibles cambios en las comunidades vegetales debidos al cambio climático, que el que se puede obtener a partir del conocimiento necesariamente incompleto de la ecofisiología de cada especie individual (Valladares *et al.*, 2004).

Las respuestas o los mecanismos para afrontar el estrés han sido denominadas estrategias, y son características de cada especie (Larcher, 1995, citado por Valladares *et al.*, 2004).

Existe en la literatura una gran diversidad de términos confusos y ambiguos para definir las estrategias para superar la sequía. Valladares y colaboradores (2004) homologan las distintas terminologías de los autores, y precisan que ante el estrés hídrico caben tres respuestas posibles: “**escapar**”, “**evitarlo**”, o “**tolerarlo**”. En el primer caso, la estrategia de las plantas consiste en completar su ciclo durante la estación húmeda; en el segundo, las especies evitan la deshidratación celular y mantienen su potencial agua alto (extrayendo más agua del suelo y/o usándola lentamente, por resistencia estomática, enrollamiento foliar, incrementando la superficie radicular, raíces suberificadas etc.). Cuando la respuesta es la tolerancia, las plantas tienen la habilidad para funcionar aún con una importante disminución de potencial agua de los tejidos, mientras se mantiene el estrés hídrico, entre otras: a) por osmoregulación a través de la síntesis de metabolitos como aminoácidos, azúcares solubles, sustancias antioxidantes, que permiten equilibrar el potencial osmótico intracelular con el del medio; b) conservando la capacidad de rebrote; c) manteniendo células pequeñas con paredes elásticas. Finalmente se incluye “la recuperación después de la sequía”, que posibilita la germinación (Li *et al.*, 2013), el mantenimiento de hojas verdes y la producción de macollos luego de la finalización de la sequía (Richards *et al.*, 2002).

Según Levitt (1980), las plantas han evolucionado hacia el desarrollo de “mecanismos que evitan” el déficit hídrico; mientras que los “mecanismos tolerantes” serían un factor que

complementarían a los mecanismos anteriores. De esta forma, el desarrollo de respuestas eficientes que evitan el estrés, permitiría no sólo sobrevivir, sino también continuar creciendo y desarrollándose en condiciones limitadas de agua (Valladares *et al.*, 2004).

De acuerdo con la sensibilidad a la salinidad las plantas pueden clasificarse en glicófitas y halófitas (Levitt, 1980; Taiz y Zeiger, 2010). Las glicófitas presentan un umbral de concentración salina por sobre el cual muestran signos de inhibición del crecimiento, pérdida de peso seco y decoloración foliar (Taiz y Zeiger, 2010); las halófitas pueden completar su ciclo de vida en una concentración salina equivalente a -2,4 MPa (Ruiz, 2009). La tolerancia real de un determinado cultivo a la salinidad varía en relación con el estado de crecimiento en el cual se inicia y finaliza la salinización, el nivel de salinidad alcanzado y la estructura de cosecha del cultivo de interés (Shannon y Grieve, 1999). En términos generales, la tolerancia a la salinidad es mayor en Dicotiledóneas que en Monocotiledóneas (Munns y Tester, 2008). Por lo tanto, la tolerancia a la salinidad se describe como una función compleja de la disminución del rendimiento a través de una gama de concentraciones de sal (Shannon y Grieve, 1999).

Frecuentemente la tolerancia al estrés hídrico se asocia con la tolerancia al salino (Munns, 2002); sin embargo, es sabido que algunas halófitas no pueden tolerar el estrés hídrico, y algunas xerófitas no toleran el salino, cuando el principal efecto de la salinidad es la toxicidad (Zhao y Harris, 1992; Zaho *et al.*, 2003).

Respuestas de las plantas al estrés hídrico y salino

Las condiciones limitantes del ambiente determinan modificaciones de la morfología de las plantas, dentro de un rango de plasticidad, modificando características morfo-anatómicas (Perreta y Vegetti, 2005; Céccoli *et al.*, 2011). Las plantas han desarrollado una variedad de estrategias adaptativas estructurales y funcionales para enfrentar ambientes con escasez de agua (Nawaz *et al.*, 2013). Los estudios sobre las relaciones hídricas de la célula y el crecimiento muestran que la respuestas tempranas al estrés hídrico y salino son esencialmente idénticas (Munns, 2002).

La respuesta más frecuente que causa el estrés hídrico y el salino es la inhibición del crecimiento vegetal. Además, hay períodos o etapas del desarrollo, como el estadio de plántula, donde las especies pueden ser particularmente sensibles (o insensibles) a un estrés determinado (Valladares *et al.*, 2004). Anatómicamente afecta los procesos de división y expansión celular (Zidan *et al.*, 1990), el crecimiento de las células y su metabolismo, la fisiología y biología molecular (Munns y Tester, 2008). Es ampliamente reconocido que tanto las plantas glicófitas como las halófitas presentan un crecimiento óptimo en ausencia de sal (Flowers, 2004; Reginato, 2009; Golberg *et al.*, 2011; Mohammadizad *et al.*, 2013).

Respuestas en la germinación y el crecimiento de la plántula

La disponibilidad de agua y la temperatura de la cama de siembra son los principales factores ambientales que afectan la germinación de las semillas y el posterior establecimiento de las plántulas (Berkart y Briske, 1982). El estrés hídrico al comienzo del ciclo produce demoras en la emergencia y las plantas jóvenes quedan expuestas al estrés (Argüello *et al.*, 1992; Ruiz, 2009, Jamian *et al.*, 2014). La gran variación en la emergencia de un mismo lote de semillas sembrado en distintos sitios demuestra que existe una gran sensibilidad a la humedad disponible en el suelo (Heydecker, 1969). Los estudios de germinación en condiciones de estrés hídrico de *Lupinus albus* y *L. angustifolius* demostraron que el porcentaje de germinación disminuyó significativamente (50% y 20% respectivamente) cuando el Ψ_a fue de -0,8 MPa (Perissé *et al.*, 2002); de igual modo en *Phaseolus mungo* L., 75% con un Ψ_a de -0,5 MPa (Pratap y Sharma, 2010), para *Lens culinaris* Medik. la germinación disminuyó al 70% cuando el Ψ_a fue de -0,6 MPa (Sağlam *et al.*, 2010), y en *Eremosparton songoricum* (Livitt.) Vass. (Fabacea), al 15% con un Ψ_a de -0,9 MPa (Li *et al.*, 2013). Fatemi (2014) señaló que la razón de la disminución del porcentaje de germinación del “girasol” a Ψ_a de -0,4 MPa se debió a una imbibición más lenta; mientras que, según Pratap y Sharma (2010) la reducción en la germinación a altos niveles de estrés hídrico, se pueden atribuir a un déficit de humedad en la semilla por debajo de un umbral que conduce a la degradación o inactivación de enzimas hidrolíticas. En relación al desarrollo de la plántula, en todos los casos a mayor estrés hídrico la respuesta fue una disminución en el crecimiento del sistema caulinar y radical (Perissé *et al.*, 2002; Pratap y Sharma, 2010; Sağlam *et al.*, 2010; Li *et al.*, 2013; Fatemi, 2014).

La salinidad puede inhibir la germinación y el crecimiento de las plantas como el producto combinado de estrés hídrico, toxicidad iónica y desequilibrio nutricional (Leidy y Pardo, 2002), o como una respuesta activa y regulada de la planta (Rewald *et al.*, 2013). Se mencionan diversos efectos como la reducción de la turgencia y el crecimiento, la pérdida de la estructura celular por desorganización de membranas, e inhibición de la actividad enzimática (Leidy y Pardo, 2002). Cuando el estrés osmótico es moderado, hojas y tallos disminuyen su crecimiento con la consiguiente acumulación de solutos y la manifestación del ajuste osmótico, mientras que la raíz puede continuar creciendo (Hadiarto y Tran, 2011). Las raíces parecerían ser el órgano más vulnerable por su exposición directa a la salinidad o sequía del suelo, pero son resistentes ya que su crecimiento no se ve tan afectado como el sistema caulinar (Munns, 2002). Estudios sobre el efecto del estrés hídrico y salino en *Nepetes persica* Poit. ex Benth. (Lamiaceae), concluyen en que altos niveles de estrés influyen negativamente en la germinación y crecimiento de la plántula (Mohammadizad *et al.*, 2013).

Respuestas en la anatomía de la plántula

Es ampliamente reconocido que los meristemas apicales y el patrón radial de la distribución de los sistemas de tejidos queda determinado en los estadios tempranos de la embriogénesis (Laux y Jürgens, 1997; Evert, 2008; Taiz y Zeiger, 2010), y que con el comienzo de la germinación los meristemas apicales derivados primarios de la raíz (protodermis, meristema fundamental y procambium) se diferencian en la epidermis, corteza y cilindro central (Evert, 2008; Taiz y Zeiger, 2010). Éstos representan una unidad estructural y funcional que debe cumplir con la protección, el transporte de agua y nutrientes, almacenamiento y diversas funciones metabólicas que aún no están bien comprendidas (Evert, 2008; Saleem *et al.*, 2010).

En relación a las respuestas y cambios en la anatomía de la raíz como resultado de la exposición al estrés hídrico, se han documentado diversas estrategias adaptativas de las plantas para sobrevivir en estos ambientes adversos (Ruiz, 2009; Peña-Valdivia *et al.*, 2010). Fahh y Cutler (1992) reconocen que las adaptaciones anatómicas de las raíces primarias de halófitas y xerófitas son similares.

En especies silvestres y domesticadas de *Phaseolus vulgaris* sometidas a diferentes niveles de estrés hídrico se comprobó que la epidermis se adelgazó, el área comprendida por el parénquima cortical disminuyó junto con el número de células, y se observaron miembros de vaso del protoxilema de menor diámetro y paredes con mayor grosor (Peña-Valdivia *et al.*, 2010).

Las raíces tienen dos “vainas fisiológicas”, la exodermis y la endodermis, que juegan roles importantes en la función básica de absorción y de protección frente al estrés (Enstone *et al.*, 2003). La exodermis puede presentarse como una capa uni o pluricelular homogénea o heterogénea; la endodermis se distingue por presencia de las bandas de Caspary, que son una modificación de las paredes por agregado de lignina y suberina en no más de un tercio de las paredes anticlinales, e íntimamente adheridas a la membrana plasmática (Enstone *et al.*, 2003; Nawrath *et al.*, 2013). Las bandas de Caspary forman una barrera al flujo apoplástico forzando a los iones a pasar a través de la selectividad de la membrana plasmática (Esau, 1982; Fahn y Cuttler, 1992, Taiz y Zeiger, 2010). Se han señalado modificaciones de las paredes endodérmicas en respuesta al estrés hídrico (Fahn y Cuttler, 1992) y salino, como la densidad de la banda, cantidad de suberina y lignina, y los componentes hidrofóbicos que afectarían la eficiencia de la banda de Caspary como barrera en el transporte radial (Chen *et al.*, 2011).

En la última década se han retomado las investigaciones relacionadas con la presencia de engrosamientos en “fi” (ϕ) en distintas capas de la corteza radical en varias familias de Angiospermas, incluyendo Leguminosas como *Arachis hypogaea* L., *Caesalpinia peltophoroides* Benth., entre otras (Fernández-García *et al.*, 2014). Estos engrosamientos de lignina se forman en las paredes radiales de las capas corticales por fuera de la endodermis, en forma continua o en grupos de células aisladas (Degenhardt y Gimmler, 2000; López-Pérez *et al.*, 2007). Actuales estudios demostraron que diferentes condiciones de estrés biótico o abiótico pueden modificar la distribución, estructura y/o desarrollo de los engrosamientos en fi (ϕ). Se ha propuesto un rol de soporte mecánico -que facilita la penetración de las raíces en suelos con impedimentos-, y uno fisiológico que involucra la alteración del movimiento apoplástico de cationes (Cabral de Melo, 2011) y la regulación del movimiento simplástico de iones vía plasmodesmos (Fernández-García *et al.*, 2014).

Estudios realizados en plántulas de *Prosopis strombulifera* (Lam.) Benth cultivadas hidropónicamente en distintas condiciones de estrés salino, demostraron que el sistema radical se caracteriza por la ausencia de pelos absorbentes, una precóz suberización y lignificación de la endodermis, y miembros de vaso del xilema con gruesas paredes lignificadas (Reginato, 2009). Se informó que en poblaciones de *Sporobolus arabicus* Boiss. sometidas a potenciales crecientes de estrés salino, presentaron una raíz con exodermis significativamente lignificada, un parénquima cortical desintegrado formando un aerénquima, y que el crecimiento medido como la relación biomasa tallo/raíz, aumentó (Hammeed *et al.*, 2013). Según este autor, dicha relación demostró ser una de las características prominentes en la mayoría de las halófitas.

Estudios similares sobre el efecto de la salinidad en el crecimiento y atributos anatómicos de plántulas de “cebada” (*Hordeum vulgare* L.) demostraron que los tratamientos con alta concentración de cloruro de sodio inhiben el crecimiento de la biomasa aérea y radical. Los estudios anatómicos demostraron que en algunas variedades aumentó el grosor de la exodermis y en otros se redujo el espesor de la exodermis y endodermis, y el cilindro central disminuyó su diámetro (Atabayeva *et al.*, 2013). Los estudios realizados en raíces de *Chloris gayana* Kunth., concluyen que la biomasa radical fue más sensible al estrés salino que la caulinar, sugiriendo que los mecanismos que controlan el crecimiento caulinar son menos sensibles que los que controlan el crecimiento radical; y que a niveles altos de concentración de cloruro de sodio, disminuyó el diámetro del cilindro central (Céccoli *et al.*, 2011).

Según Reinhardt y Rost (1995b), plántulas de algodón (*Gossypium hirsutum* L. cv Acala SJ-2) expuestas a la salinidad mostraron una mayor vacuolización celular principalmente en la corteza. Otros de los efectos manifestados fueron la diferenciación prematura de los miembros de tubo del protofloema, una densa tinción de la endodermis y el parénquima xilemático y la inducción a la formación de raíces laterales más próximas al ápice. Por otra parte, según Leidy y Pardo (2002) las características anatómicas y morfológicas de la raíz pueden indicar la capacidad de adaptación a la salinidad (Reinhardt y Rost, 1995a; Maggio *et al.*, 2001).

Respuestas a nivel celular

La sequía, la salinidad y el frío son factores que conducen a la deshidratación celular, la cual produce estrés osmótico que a su vez limita la absorción de agua del suelo (García-Morales *et al.*, 2013). Las principales consecuencias del estrés salino en la célula vegetal son el déficit hídrico y el desbalance iónico que afectan directamente el desarrollo y supervivencia de las plantas (Carrasco Ríos, 2004). La plasticidad de la membrana plasmática es una propiedad clave en la resistencia de la célula durante el estrés hídrico y en la optimización de los métodos de preservación (Dupont *et al.*, 2010).

Las condiciones de estrés ambientales conducen a la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS, reactive oxygen species), éstos son productos altamente reactivos generados por una reducción gradual de oxígeno (O₂) o por absorción de energía. En el primer caso, conduce a la formación de radicales libres (O₂^{*-}, H₂O₂, ^{*-}OH); en el segundo, la formación de ¹O₂ causando la disrupción de la homeostasis celular (Sharma *et al.*, 2011). Los ROS causan peroxidación, de-esterificación de los lípidos de las membranas y desnaturalización de las proteínas (Saibo *et al.*, 2009), lo cual afecta la estructura celular y el metabolismo (Verslues *et al.*, 2006; Lee *et al.*, 2009).

El ajuste osmótico involucra una red de acumulación de moléculas orgánicas en la célula para disminuir el potencial osmótico del citoplasma y la vacuola, y así, conseguir disminuir el potencial hídrico. Entre estos componentes orgánicos denominados osmolitos u osmoprotectores, que no interfieren en el metabolismo celular a concentraciones elevadas, se encuentran la glicina betaína, la prolina, el sorbitol, la sacarosa, etc. (Carrasco Ríos, 2004).

La percepción del estrés y la consiguiente transmisión de señales para activar una respuesta adaptativa, son componentes críticos para la supervivencia de las especies en condiciones ambientales extremas: sequía, salinidad o frío (García-Morales *et al.*, 2013).

Las plantas han desarrollado un sistema antioxidativo complejo de enzimas que incluye POD (peroxidasa), SOD (dismutasa superóxido) y CAT (catalasa) para evitar o aliviar el daño causado por las ROS (Khan y Panda, 2008).

La raíz, como principal órgano de absorción de agua e iones, tiene gran importancia en la respuesta a corto y largo plazo al estrés salino. En este órgano se sintetiza ácido abscísico (ABA), una de las señales tempranas de estrés capaz de producir cambios fisiológicos locales (conductividad hidráulica) y a distancia (cierre estomático) (Hartung *et al.*, 2002).

La aclimatación al estrés osmótico es un proceso complejo, que involucra numerosos cambios que incluyen: disminución del crecimiento, alteración en la expresión de genes, incremento en los niveles de ácido abscísico (ABA), acumulación de solutos compatibles y de proteínas protectoras, ajuste en el transporte iónico e incrementos en los niveles de antioxidantes (Saibo *et al.*, 2009; Hadiarto y Tran, 2011). Según Valladares *et al.* (2004), el desafío es integrar estas respuestas y síndromes, simular la respuesta diferencial de las especies en un escenario de cambio climático, y llegar a validar experimentalmente estas simulaciones.

Teniendo en cuenta la importancia del conocimiento o identificación de especies tolerantes que puedan ser incorporadas en las áreas afectadas por estrés hídrico y/o salinización, y en base a los antecedentes, se postula la siguiente hipótesis:

Las respuestas morfo-anatómicas en plántulas de *Vicia dasycarpa* cv. Tolse F.C.A. germinadas en condiciones de estrés hídrico y salino, involucran variaciones en el crecimiento que afectan los tres sistemas de tejidos. Las características morfológicas y ultraestructurales a nivel radical permiten explicar dichas respuestas en los tratamientos más severos.

Los objetivos de este capítulo fueron: identificar las variaciones morfo-anatómicas en plántulas germinadas bajo condiciones de estrés hídrico y salino; analizar la anatomía de raíces de plántulas provenientes de semillas recuperadas; investigar la ultraestructura celular de las raíces en los tratamientos más severos de estrés hídrico y salino, y en las recuperadas.

MATERIALES Y MÉTODOS

Parámetros de crecimiento

Para evaluar el crecimiento al finalizar el ensayo, se tomaron para el control ($\Psi_a = 0$ MPa) y cada tratamiento (PEG y CINA, $\Psi_a = -0,3; -0,6; -0,8; -1$ y $-1,2$ MPa) dos muestras de diez plántulas cada una, de los ensayos de germinación llevados a cabo según la metodología descrita en el Capítulo 4. Se individualizaron las plántulas anormales según normas ISTA (2004), se tomaron registros fotográficos y se determinaron los siguientes parámetros:

-Índice Longitud del vástago/Longitud de la raíz.

-Índice Peso seco del vástago/Peso seco de la raíz.

Las plántulas se midieron desde el nudo cotiledonar hasta la yema terminal y hasta el extremo de la raíz, para calcular el índice longitud del vástago/longitud de la raíz. La determinación del peso seco del vástago y de la raíz se realizó colocando las muestras de las plántulas de cada tratamiento en bolsas de papel, y se procedió a su secado en una estufa de convección forzada (Memeret) a $60\text{ }^{\circ}\text{C}$, hasta obtener un peso constante (aproximadamente 48 horas) y luego se pesaron una balanza Mettler AB con precisión de $0,1\text{mg}$.

El tratamiento de las variables continuas se llevó a cabo mediante un análisis de varianza ANOVA, aplicando los test de Duncan y LSD ($p < 0,05\%$).

Plántulas anormales

La identificación del tipo de anomalías que se presentaron se realizó en base al manual ISTA (2004) de evaluación de plántulas, teniendo en cuenta que las de *Vicia dasycarpa* cv. F.C.A. corresponden al tipo G, Grupo A-2-2-2-2.

Según se define en las reglas ISTA (2004), se considera plántula anormal aquella que no presenta la capacidad para desarrollarse en una plántula normal cuando crece en el suelo bajo condiciones favorables, debido a que tiene una o más de sus estructuras esenciales irreparablemente defectuosas. Se pueden mencionar el sistema radical ausente, defectuoso, con geotropismo negativo; en el sistema caulinar los cotiledones dañados, el epicótilo defectuoso, ausente o formando un espiral, entre otros, y su yema apical dañada o ausente.

Estudios anatómicos

Se tomaron muestras de raíces de los tratamientos control, estrés hídrico y salino con $\Psi_a = -1,2$ MPa, y de plántulas obtenidas de semillas recuperadas 12 días después de estos últimos tratamientos. Las muestras se fijaron en FAA, y se siguió la metodología para realizar preparados permanentes coloreados con safranina y verde rápido para microscopía óptica (MO), según Zarlavsky (2014). Los preparados fueron observados con microscopio Zeiss y se tomaron registros fotográficos con equipo Motic. Para los estudios con MET los materiales vegetales fueron pre-fijados durante una noche en glutaraldehído al 2,5% con un buffer de fosfato ácido (pH=7,2). Luego se post-fijó en tetróxido de osmio (OsO_4) a 2 °C en el mismo buffer durante 3 horas. Tras la deshidratación en una serie ascendente de etanol, el material se incluyó en resina Spurr. Se cortaron secciones delgadas (1 μm) con un ultra micrótomo Reichert-Jung y se tiñeron con azul de toluidina. Con el mismo ultra micrótomo se realizaron secciones ultradelgadas (750 a 900 nm) y luego se tiñeron con acetato de uranilo y citrato de plomo (O'Brien y McCully, 1981). Se observaron y fotografiaron con un con un microscopio de transmisión JEOL 1200 EX II.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Respuestas morfológicas en plántulas desarrolladas en condiciones de estrés hídrico y salino

El crecimiento de las plántulas para cada uno de los tratamientos a los 15 días de comenzado el ensayo se muestra en la Figura 5.1. Para el tratamiento control se observa el desarrollo de una plántula normal de germinación criptohipógea con una raíz principal y raíces laterales, el epicótilo desarrollado, la presencia de tres catafilos, el primer protofilo, y

los nomófilos. Todo esto posibilita el desarrollo autótrofo, lo cual permite predecir una exitosa implantación. Estos resultados concuerdan con la afirmación de diversos autores (Flowers, 2004; Reginato, 2009; Golberg *et al.*, 2011; Mohammadizad *et al.*, 2013) en relación a la óptima expresión del crecimiento en ausencia de estrés.

Todos los tratamientos que simulaban deficiencia hídrica y salina afectaron el crecimiento de la raíz y del vástago. Morfológicamente, esta respuesta se relaciona con la inhibición de la elongación y división celular, debidos a cambios bioquímicos y moleculares indicados por Saibo *et al.* (2009), Taiz y Zeiger (2010), y Rewald *et al.* (2013). La variación de los índices que relacionan la longitud del vástago con la de la raíz, y el peso seco del vástago con el de la raíz, indican que tanto el estrés hídrico como el salino afectan el crecimiento general de la plántula (Tabla 5.1 y 5.2). Estos índices revelan que las plántulas sometidas a estrés salino manifiestan una mejor respuesta que aquéllas sometidas a estrés hídrico. Se destaca la respuesta en el crecimiento del vástago y de la raíz, con un potencial de -0,3 y -0,6 MPa (tratamientos con PEG y cloruro de sodio) que se mantiene constante. Aún cuando se ha reportado como generalidad que el sistema radical se afecta menos que el caulinar (Munns, 2002; Munns y Tester, 2008), los resultados indican que no hay una estimulación del crecimiento radical a medida que disminuye el potencial agua, en contraposición por lo generalizado en distintas especies por Reginato (2009), y Pratap y Sharma (2010). Por el contrario, los tratamientos más severos (-0,8 y -1 MPa) indican claramente que el peso seco de la raíz se ve afectado más que el del vástago, en concordancia con lo señalado por Mohammadizad *et al.* (2013) en los estudios sobre los efectos del estrés salino e hídrico en la germinación y crecimiento de plántulas de *Nepeta pérsica*, y Céccoli *et al.* (2011) en *Chloris gayana* sometida a estrés salino. Estos resultados concuerdan con los señalados por Li *et al.* (2013), respecto a que las plántulas *Eremosparton songoricum* (Fabacea) son sensibles al estrés hídrico, responden rápidamente, pero no toleran la sequía por un largo período. Las diferencias encontradas en el crecimiento del sistema radical y el caulinar en los tratamientos con estrés hídrico (PEG, $\Psi_a = -0,3$ y $-0,6$ MPa), se ajustan con las reportadas por Sağlam *et al.* (2010) en *Lens culinaris*, y Perissé (1997) en *Lupinus albus* y *L. angustifolius*. Sin embargo, el cultivar Tolse F.C.A. de *V. dasycarpa* refleja un comportamiento superior a *L. culinaris*, *L. albus* y *L. angustifolius*, frente al estrés hídrico.

La evaluación de las plántulas provenientes los tratamientos de estrés hídrico con potenciales de hasta -1,2 MPa y salino de hasta -1 MPa, revela que éstas desarrollan una raíz primaria intacta, algunas con suficientes raíces laterales y los cotiledones se mantienen íntegros con la cubierta seminal. Aunque el epicótilo y el sistema caulinar en general muestran diferencias en su desarrollo en longitud, la yema terminal se distingue intacta. Estos resultados ponen de manifiesto que los mecanismos que regulan el crecimiento del sistema radical son más sensibles al estrés hídrico, y especialmente al salino, que los correspondientes al sistema caulinar. Entonces es razonable esperar que las plántulas en condiciones de estrés salino, aún con un menor desarrollo se establezcan exitosamente.

El hecho de que el sistema caulinar resulte menos sensible que el radical indica que, luego de producida la germinación *sensu stricto*, durante el crecimiento heterótrofo del embrión y temprano de la plántula, el meristema caulinar (MAC) ejerce una dominancia apical sobre el meristema apical radical (MAR) en la partición de reservas y asimilados.

Entre las anormalidades observadas en los tratamientos más severos de estrés salino entre -0,6 y -1,2 MPa se pueden citar: raíz primaria con geotropismo negativo, raíz primaria atrofiada, raíz primaria en lazo, plántulas deformes, epicótilo no desarrollado y epicótilo en lazo (Fig. 5. 2).

Se comprueba que *V. dasycarpa* cv. Tolse F.C.A. presenta una mejor respuesta frente al estrés salino que con el estrés hídrico.

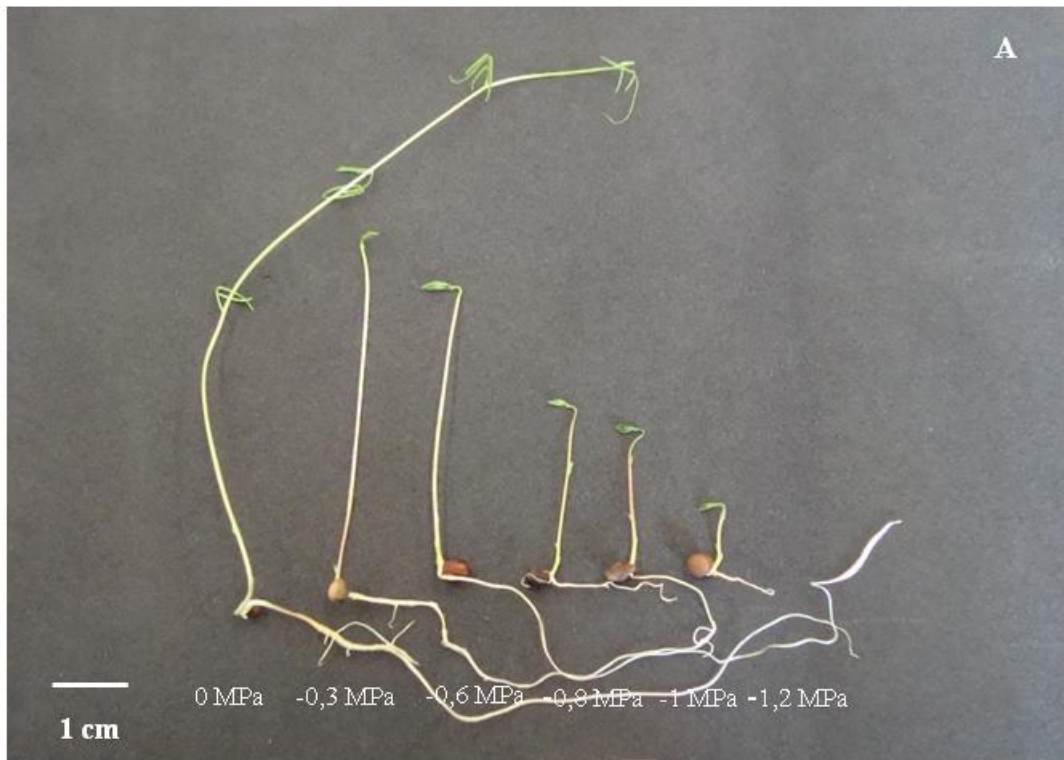


Figura 5.1. Crecimiento de las plántulas de *V. dasycarpa*, 15 días después de la siembra. A, condiciones de estrés hídrico (PEG); B, condiciones de estrés salino (CINa).

Tabla 5.1. Índice Longitud del vástago/Longitud de la raíz

Ψ_a (MPa)	Longitud del vástago/Longitud de la raíz	
0.0	2,75a	
	Estrés hídrico (PEG)	Estrés salino (ClNa)
-0.3	0,86 b	1,49 b
-0.6	0,85 b	1,59 b
-0.8	0.52 c	1,94 c
-1	0,44 d	1,84 c
-1,2	0,41 e	1,21 d

Cada valor representa la media de dos repeticiones de 10 plántulas cada una. Valores medios en cada columna seguidos de letras iguales no difieren significativamente ($p < 0,05$)

Tabla 5.2. Índice Peso seco del vástago/Peso seco de la raíz (PSV/PSR)

Ψ_a (MPa)	PSV/PSR	
0.0	0,41 a	
	Estrés hídrico (PEG)	Estrés salino (ClNa)
-0.3	0,35 b	0,78 b
-0.6	0,30 c	0,83 c
-0.8	0,17 d	1,54 d
-1	0,94 e	1,17 e

Cada valor representa la media de dos repeticiones de 10 plántulas cada una. Valores medios seguidos de letras iguales no difieren significativamente ($p < 0,05$)



Figura 5.2. Plántulas anormales de *Vicia dasycarpa* cv. Tolse F.C.A. en los tratamientos con estrés salino. A, $\Psi_a = -0,6$ MP; B, $\Psi_a = -1,2$ MPa.

Respuestas anatómicas en plántulas desarrolladas en condiciones de estrés hídrico y salino

Como se mencionó en el Capítulo 2, la anatomía de la raíz en el tratamiento control presenta la epidermis unistrata, con tricoblastos y atricoblastos, la corteza se caracteriza por tener una exodermis compacta sin espacios intercelulares, y el resto presenta células parenquimáticas uniformes, con abundantes espacios intercelulares, y la endodermis presenta la típica banda de Caspary. En el cilindro central se observan el periciclo unistrato y restos de procambium, que se encuentra entre los tejidos vasculares (Fig. 5.3).

Los estudios anatómicos en raíz permitieron establecer que, en general los tratamientos con estrés hídrico y salino disminuyen el diámetro total de la raíz principal. Mientras que para el testigo el diámetro es de 450 μm (Fig. 5.3), para los tratamientos de estrés hídrico el diámetro es de 320 μm , y para los de estrés salino de 350 μm (Figs. 5.4 y 5.5).

En los tratamientos con estrés hídrico los efectos observados fueron plasmólisis de los tricoblastos, degradación de paredes celulares y plasmólisis de las células de la corteza con gran número de espacios intercelulares (Fig. 5.4 A-C). En la zona donde se ubica la endodermis se observa una capa de tinción intensa (Fig. 5.4 C). En el cilindro central, cuando el potencial agua es -1, 2 MPa, no se distingue una clara diferencia entre los diámetros de los miembros de vaso del protoxilema, y los del metaxilema, y se observa un pronunciado engrosamiento de las paredes de los mismos. El diámetro de los miembros de vaso del metaxilema (Mx) en el tratamiento control es de 23 μm , y cuando el potencial agua es -1, 2 MPa el diámetro disminuye a 9 μm . En la recuperación, si bien las raíces recobran su estructura celular y el diámetro, en la endodermis se observa un fuerte engrosamiento que indicaría un colapso de la misma (Fig. 5.4 D-F).

En los tratamientos de estrés salino se observa la plasmólisis en las células de la corteza, el aumento de los espacios intercelulares y un menor número de capas del parénquima cortical (Fig. 5.5 A-C). La endodermis presenta poco desarrollo de bandas de Caspary, posiblemente debido a una falta de suberina. Estas variaciones pueden interpretarse como cambios para facilitar la incorporación de agua y acortar el camino de la vía

apoplástica. Se observa una disminución del diámetro de los miembros de vaso (Fig. 5.5 A y B), que facilitaría el movimiento del agua por capilaridad.

Estos registros concuerdan con los señalados por Céccoli *et al.* (2011) para *Chloris gayana* Kunth, respecto a la disminución del diámetro de la raíz, y especialmente el del cilindro central para los tratamientos con altas concentraciones de cloruro de sodio. También coinciden con resultados en *Prosopis estrombulifera* señalados por Reginato (2009), con relación al engrosamiento de la pared lignificada de los elementos del xilema y el menor diámetro del cilindro central. Sin embargo, no se observan en los tratamientos salinos en *V. dasycarpa*, una precoz suberización y lignificación de la endodermis que sí se presentan en los tratamientos de estrés hídrico. Con respecto al aumento de espacios intercelulares en la corteza y del tejido de sostén en la exodermis, señalados por Hameed *et al.* (2013) en *Sporobolus arabicus*, en *V. dasycarpa* se observan los mayores espacios pero no hay un aumento de tejido de sostén en exodermis. Esta última diferencia se puede explicar teniendo en cuenta que el esclerénquima es el tejido de sostén por excelencia en las Monocotiledóneas. Para ninguno de los tratamientos se pudo determinar la presencia de engrosamientos en ϕ , tal como lo indicaran Fernández-García *et al.* (2014) para *Arachis hypogaea* y *Caesalpinia peltophoroides*, y otros autores como Degenhardt y Grimmmler (2000) para maíz, y López-Pérez (2007) para *Brassica oleracea* cv Maratón en condiciones de estrés salino.

Las plántulas obtenidas de las semillas recuperadas de los tratamientos de estrés salino revelan en la raíz signos de una reparación parcial de la epidermis, el parénquima de la corteza no supera la plasmólisis de sus células, y la endodermis no logra su estructura celular normal (Fig. 5.5 E y F).

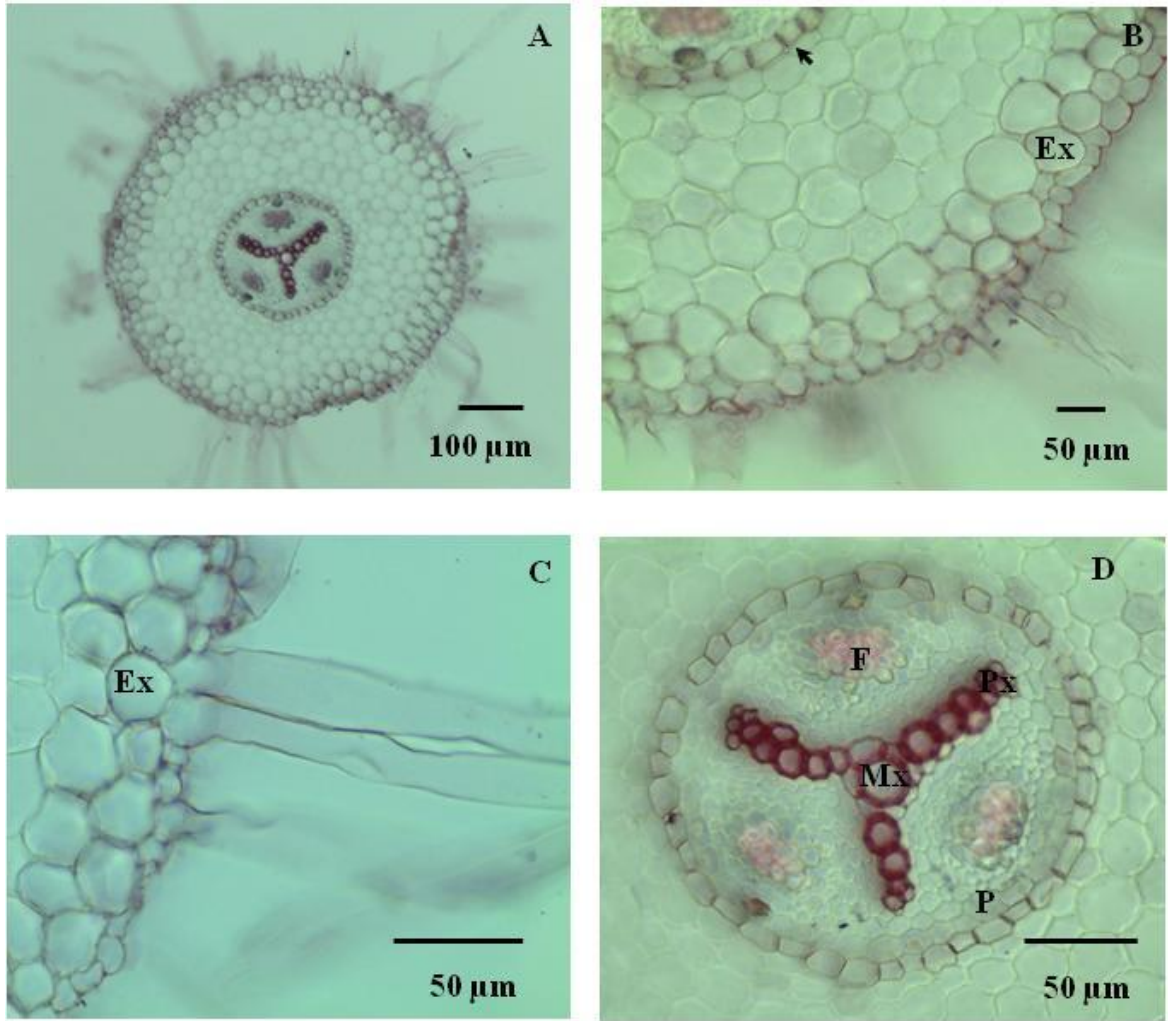


Figura 5.3. Distribución de tejidos en raíces de *Vicia dasycarpa*, tratamiento control. A, corte transversal; B, detalle de la corteza; C, detalle de la exodermis y rizodermis con pelos absorbentes; D, detalle del cilindro central. Ex, exodermis; flecha, endodermis y banda de Caspary; F, floema; Mx, metaxilema; P, periciclo; Px, protoxilema.

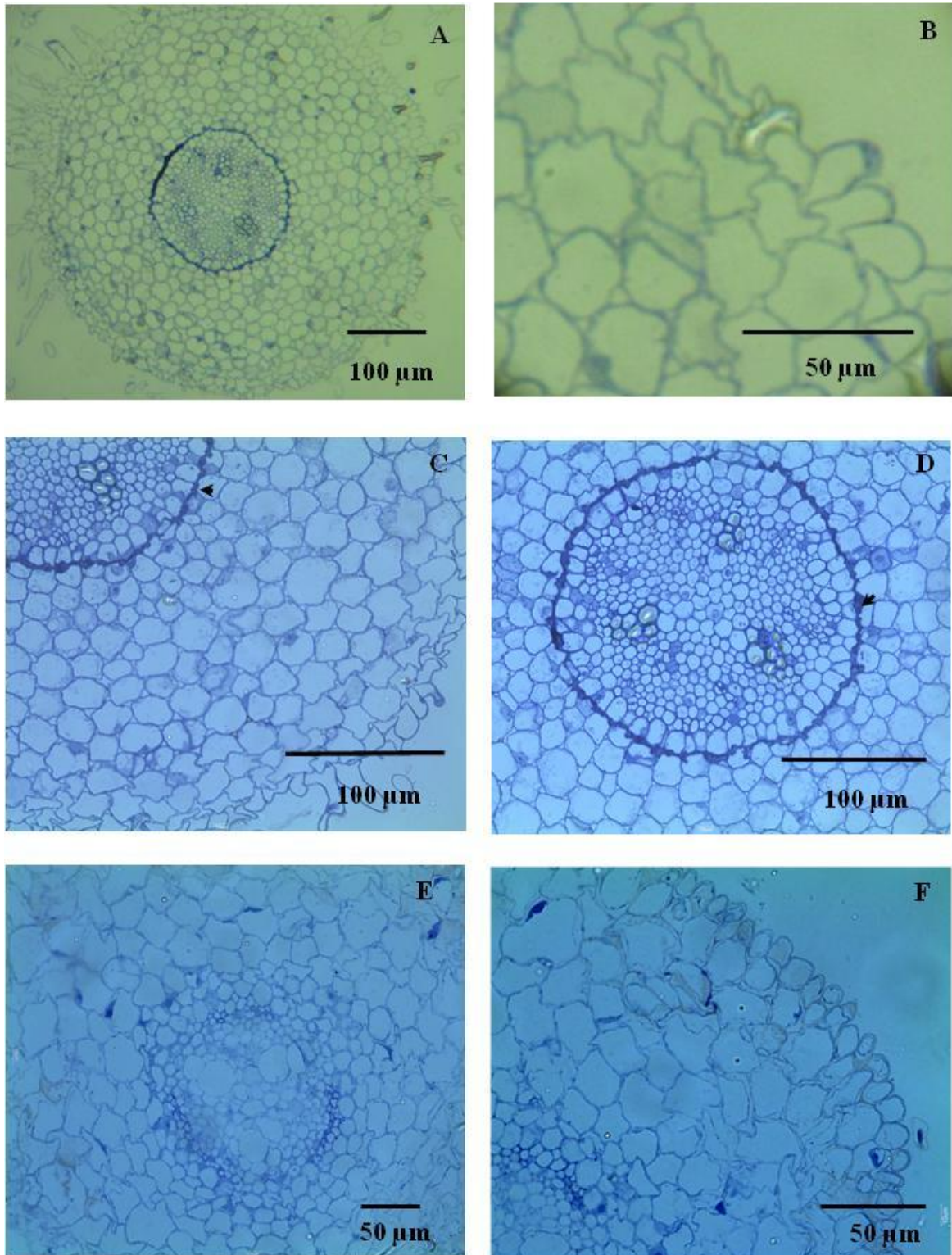


Figura 5.4. Respuestas morfo-histológicas en raíces de *Vicia dasycarpa* bajo estrés hídrico (PEG) y recuperadas. A-C, $\Psi_a = -1,2$ MPa; D-F, recuperadas $\Psi_a = 0$ MPa. Flechas, endodermis colapsada.

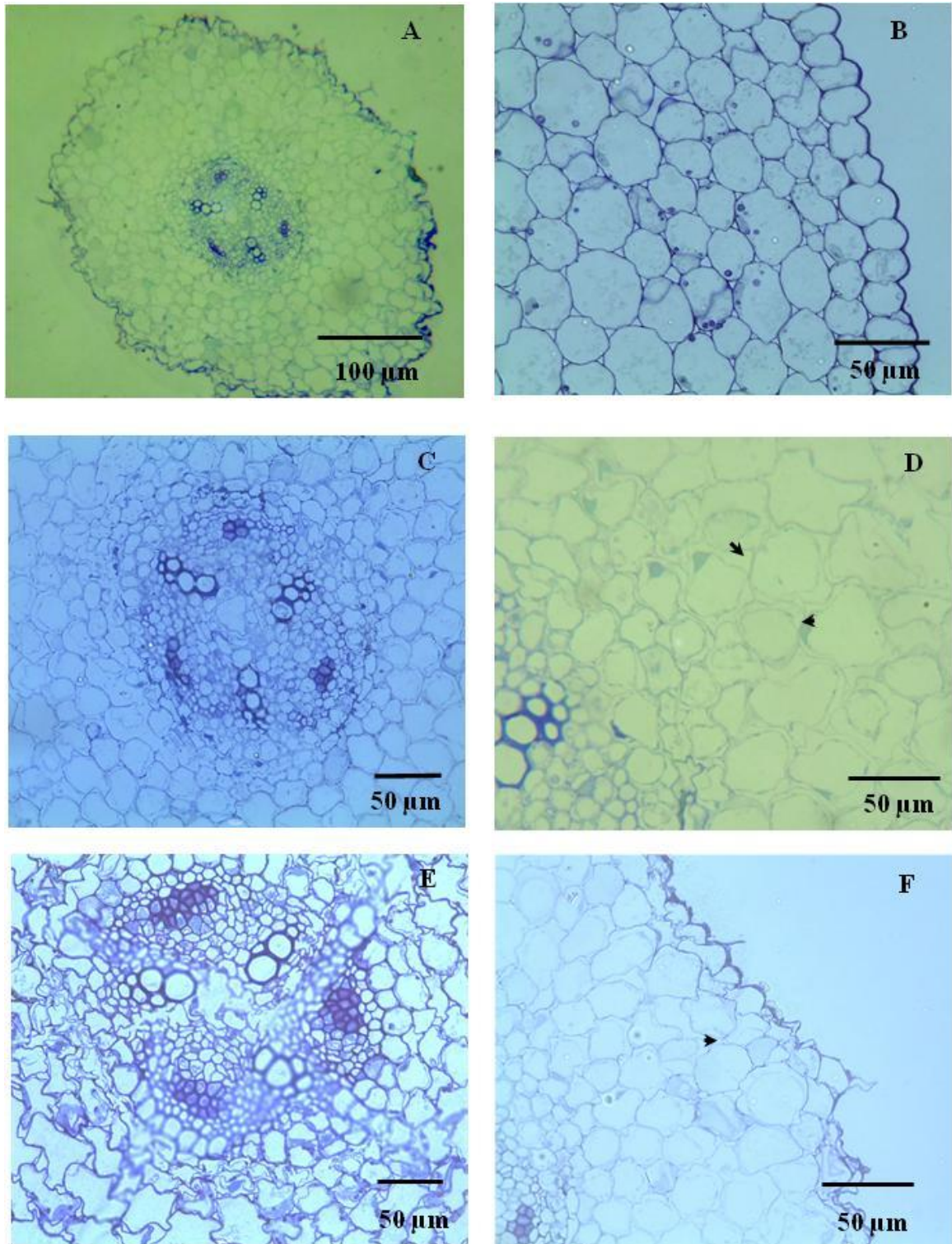


Figura 5.5. Respuestas morfo-histológicas en raíces de *Vicia dasycarpa* bajo estrés salino (ClNa) y recuperadas. A-D, $\Psi_a = -1,2$ MPa; E y F, recuperadas. $\Psi_a = 0$ MPa. E, endodermis; flechas, células plasmolizadas.

Respuestas a nivel de la ultraestructura radical al estrés hídrico y salino

En el tratamiento control la rizodermis presenta sus células epidérmicas propiamente dichas -atricoblastos- turgentes, con su pared tangencial externa significativamente convexa, y una capa cuticular delgada al igual que los pelos absorbentes -tricoblastos-. En los tratamientos más severos de estrés hídrico, las células que componen la rizodermis y la corteza muestran sus paredes delgadas, el citoplasma con un grado significativo de desorganización y no se distinguen claramente vacuolas ni organelas (Fig. 5.6 A y C). En los ensayos de recuperación, el sistema dérmico no se recupera completamente (Fig. 5.6 B y D).

En los tratamientos control se observan las características propias de la endodermis (Fig. 5.7 A), células turgentes con pared primaria y laminilla media bien diferenciadas, vacuolas pequeñas, y una gran vacuola central (Fig. 5.9 B) que desplaza al prominente núcleo ubicado lateralmente. En el citoplasma se visualizan numerosos plástidos y retículo endoplasmático. En las paredes radiales se observa la característica banda de Caspary con una electrodensidad diferente (gris claro homogéneo típico de la suberina) al de la membrana plasmática y pared. Se puede diferenciar además, la laminilla media con su elevada electrodensidad y la pared primaria de aspecto fibrilar y menor electrodensidad. El periciclo se observa en reciente división celular, con una pared celular delgada y organelas conspicuas (Fig. 5.7 B).

En los tratamientos más severos de estrés hídrico (PEG, $\Psi_a = -1,2$ MPa) se observa cómo la endodermis se colapsa, las paredes celulares se engruesan, se forma una capa interna de suberina continua, y el citoplasma se presenta completamente desorganizado (Fig. 5.8). De la comparación entre las células de la corteza de plántulas provenientes de semillas recuperadas, luego del estrés hídrico, con la endodermis del tratamiento control, se observa que las células endodérmicas aparentemente se recuperaron, pero no resultan funcionales. Las paredes celulares están más gruesas, se degradó la banda de suberina continua, pero no se recupera la banda de Caspary. Las células se vacuolizan y se observa la recuperación de los plástidos (Fig. 5.9).

Los resultados de los tratamientos con estrés hídrico se explican si se considera que la lamela de suberina que reviste internamente la pared de la célula endodérmica y su

obliteración, prioriza el transporte del agua en forma axial sobre el radial, y la endodermis pasa a cumplir función de protección contra la deshidratación del cilindro central, acorde con lo señalado por Enstone *et al.* (2003), pudiéndose interpretar como una adaptación de aquellas plantas que sufren déficit hídrico y que pierden la epidermis y la corteza.

Los tratamientos de semillas germinadas en condiciones de estrés salino se muestran en la Figura 5.10, las células endodérmicas mantienen su forma prismática, a diferencia de lo que ocurre en los tratamientos con PEG. Sin embargo, la endodermis se observa con degradación de suberina o ausente, y se distinguen pocas organelas.

Del análisis de las características ultraestructurales de raíces de plántulas provenientes de las semillas puestas a germinar en condiciones de estrés salino, y luego recuperadas (Fig. 5.11), se pone de manifiesto que el sistema dérmico y la corteza logran una recuperación parcial.

Las alteraciones encontradas a nivel ultraestructural en las raíces desarrolladas en condiciones de estrés hídrico y salino, y su recuperación, podrían explicarse por la generación y acumulación de ROS (especies oxígeno reactivas), que conduce al daño oxidativo de lípidos, proteínas y ácidos nucleicos (Sharma *et al.*, 2011), y según Lee *et al.* (2009) a la inducción a la transcripción de genes (KCS20 y KCS2/DAISY), involucrados en la biosíntesis de suberina en la endodermis.

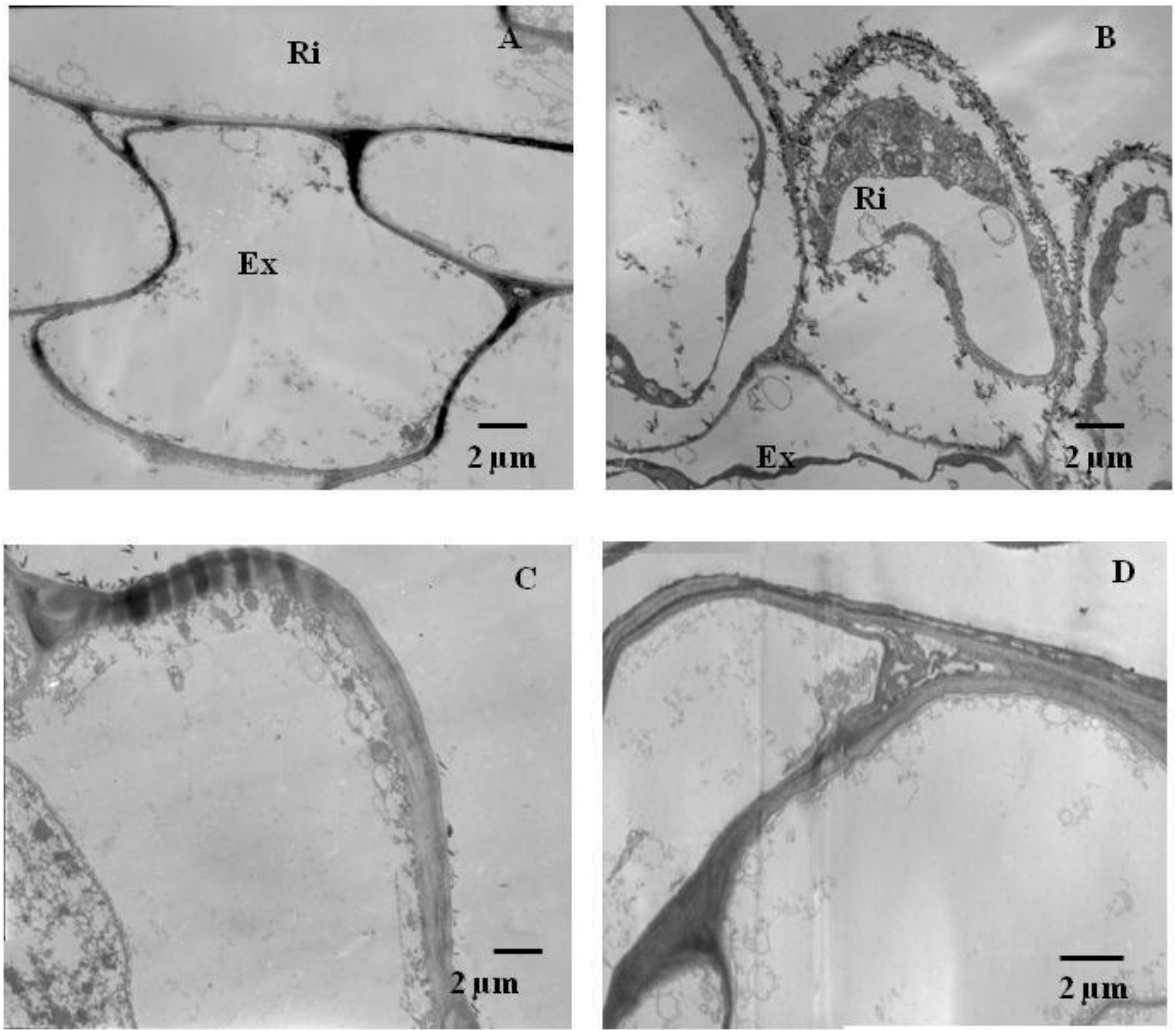


Figura 5.6. Rizodermis y exodermis en condiciones de estrés hídrico (PEG, $\Psi_a = -1,2$ MPa), salino (ClNa, $\Psi_a = -1,2$ MPa) y recuperadas. A, $\Psi_a = -1,2$ MPa (PEG); B, recuperada ($\Psi_a = 0$ MPa); C, $\Psi_a = -1,2$ MPa (ClNa); D, recuperada ($\Psi_a = 0$ MPa).

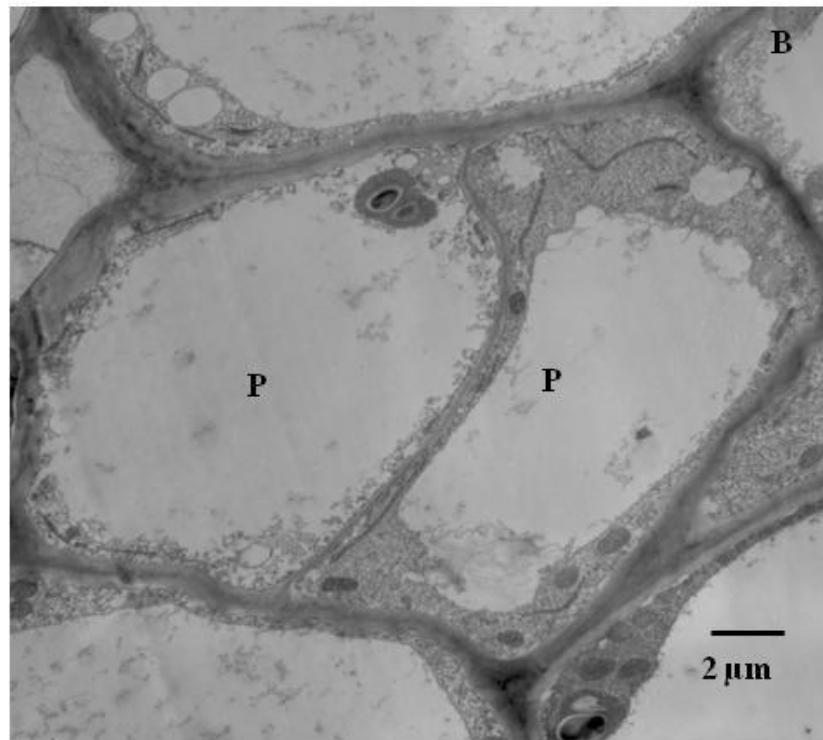
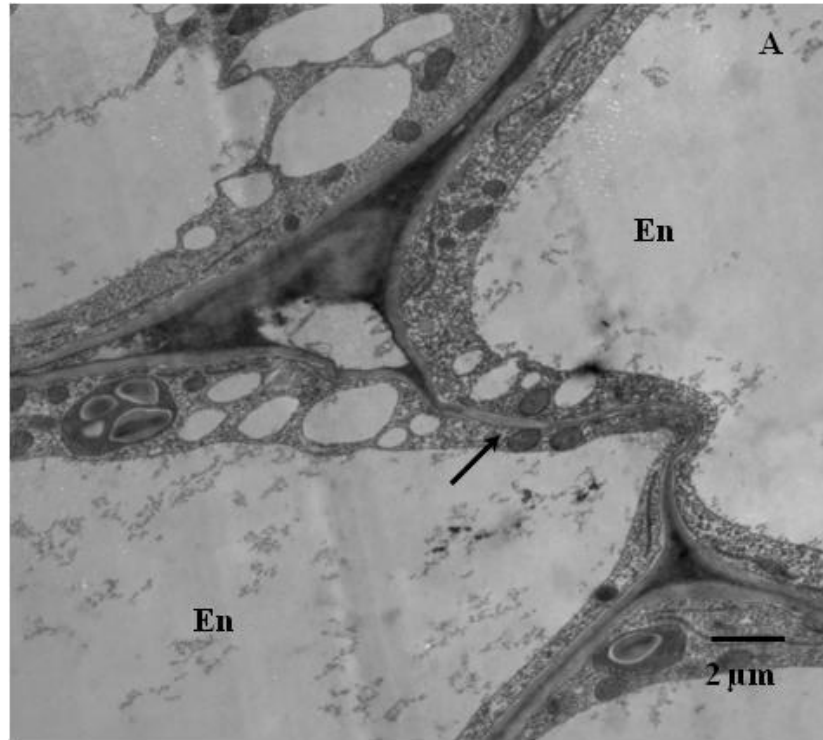


Figura 5.7. Ultraestructura de la endodermis y el periciclo en tratamiento control de *V. dasycarpa*. A, pared radial entre dos células endodérmicas; B, periciclo en división. En, endodermis; flecha, banda de Caspary; P, periciclo.

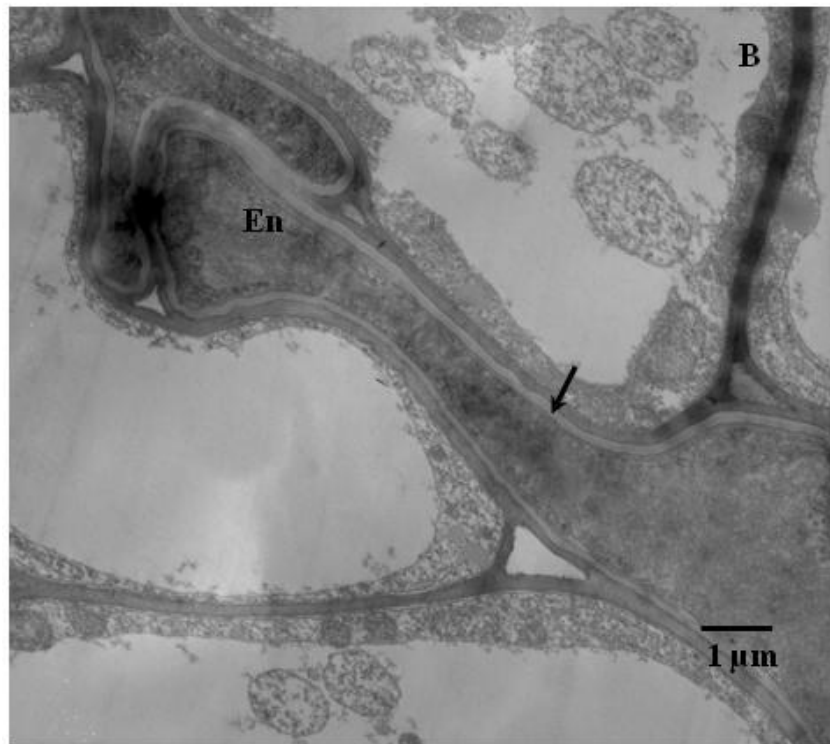
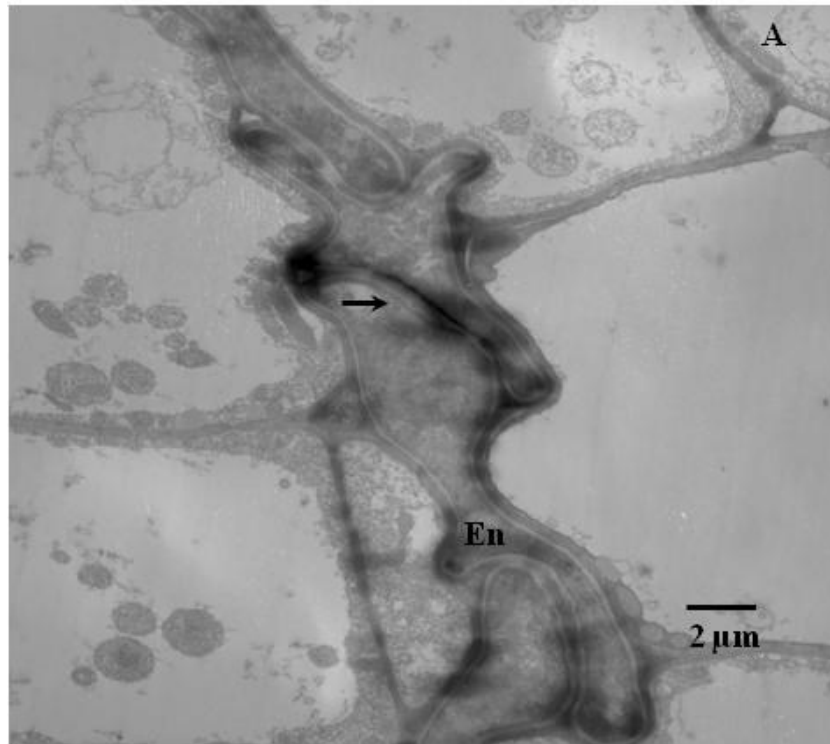


Figura 5.8. Ultraestructura de la endodermis de *V. dasycarpa* germinada en condiciones de estrés hídrico (PEG, $\Psi_a = -1,2$ MPa). A y B, detalle de la endodermis colapsada con engrosamientos de suberina. En, endodermis; flecha, suberina.

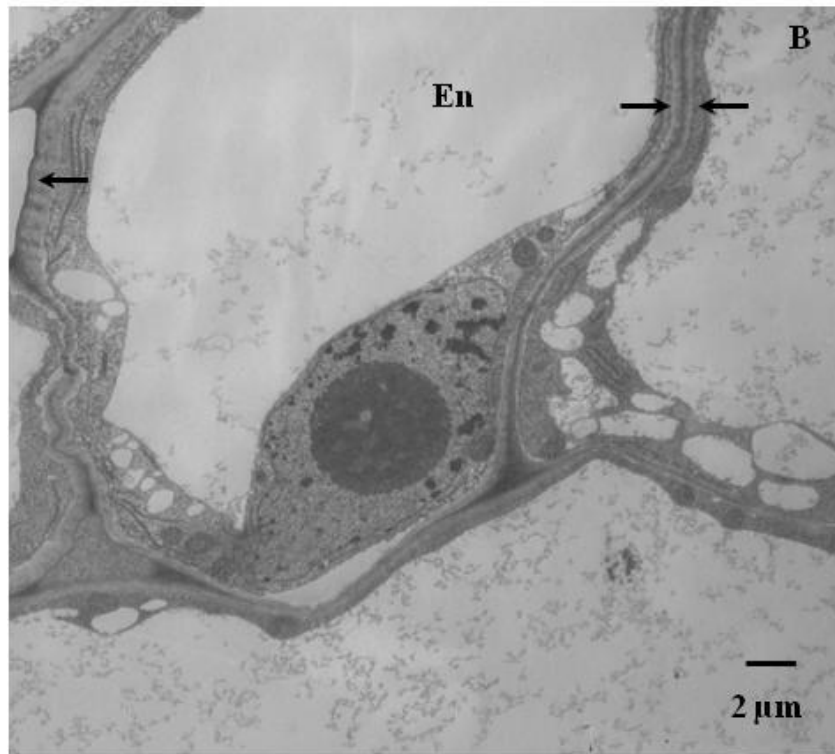
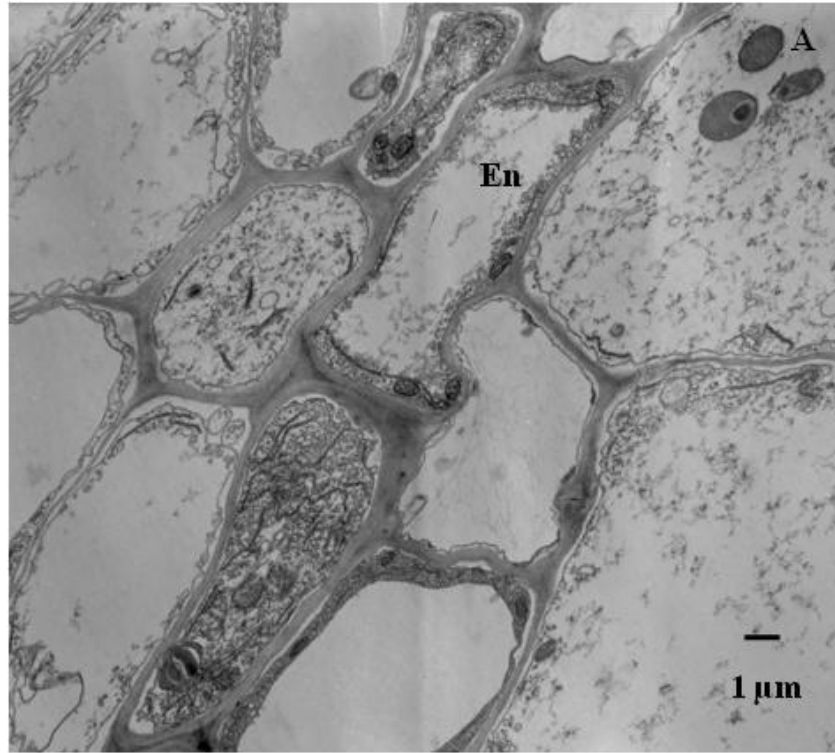


Figura 5.9. Comparación de células endodérmicas de raíces recuperadas del tratamiento con estrés hídrico (PEG, $\Psi_a = -1,2$ MPa). A, recuperadas; B, control. En, endodermis; flechas, laminilla de suberina continua.

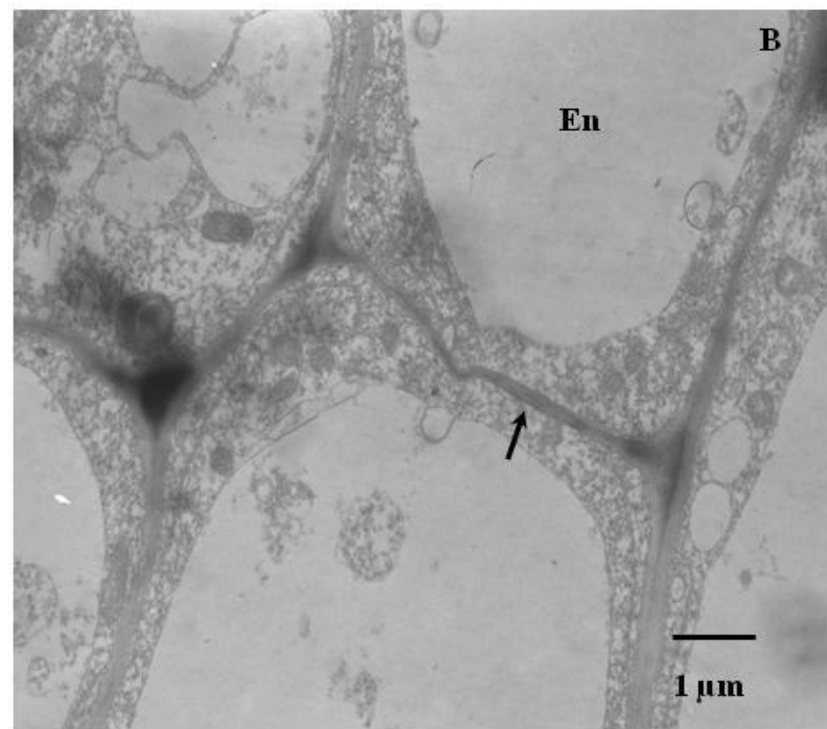
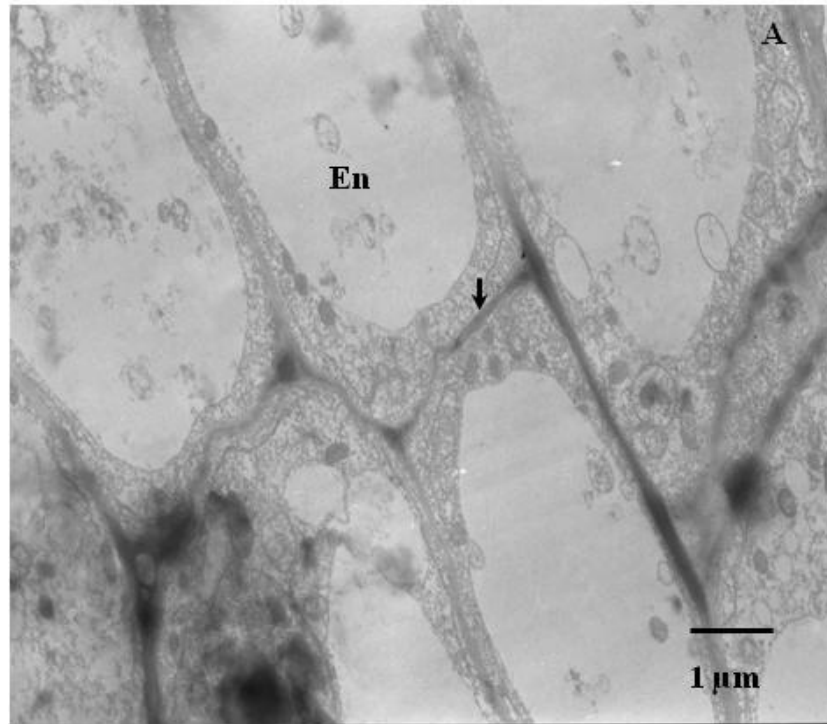


Figura 5.10. Detalle de células endodérmicas de raíces germinadas en condiciones de estrés salino (CINa, $\Psi_a = -1,2$ MPa) A, endodermis con degradación de suberina; B, endodermis sin suberina. En, endodermis; flechas, banda de Caspary.

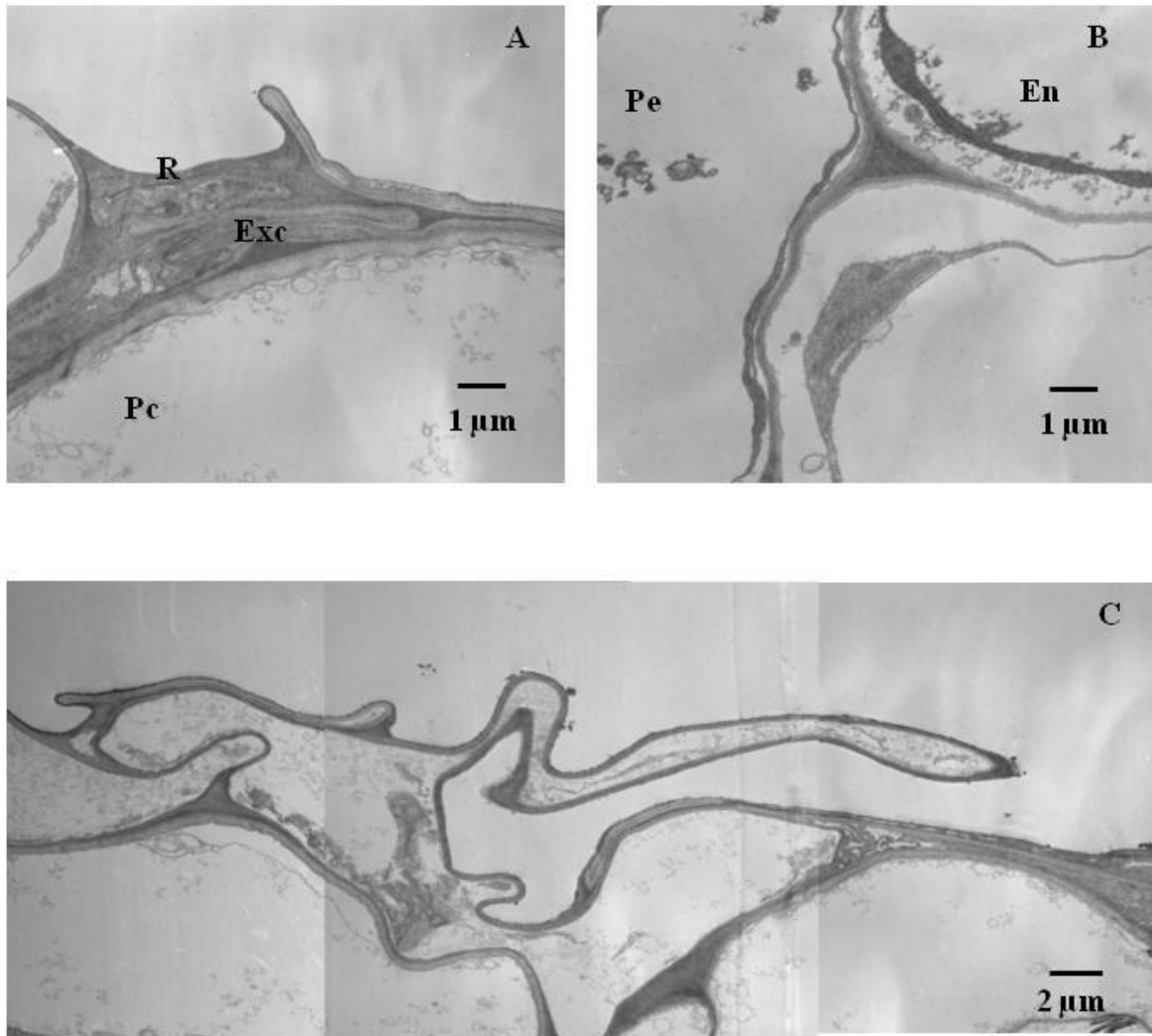


Figura 5. 11. Ultraestructura de raíces de semillas recuperadas luego del estrés salino (CINa, $\Psi_a = -1,2$ MPa). A, sección de rizodermis y parénquima cortical; B, endodermis; C, pelo absorbente. Exc, exodermis colapsada; Pc, parénquima cortical; Ri, rizodermis.

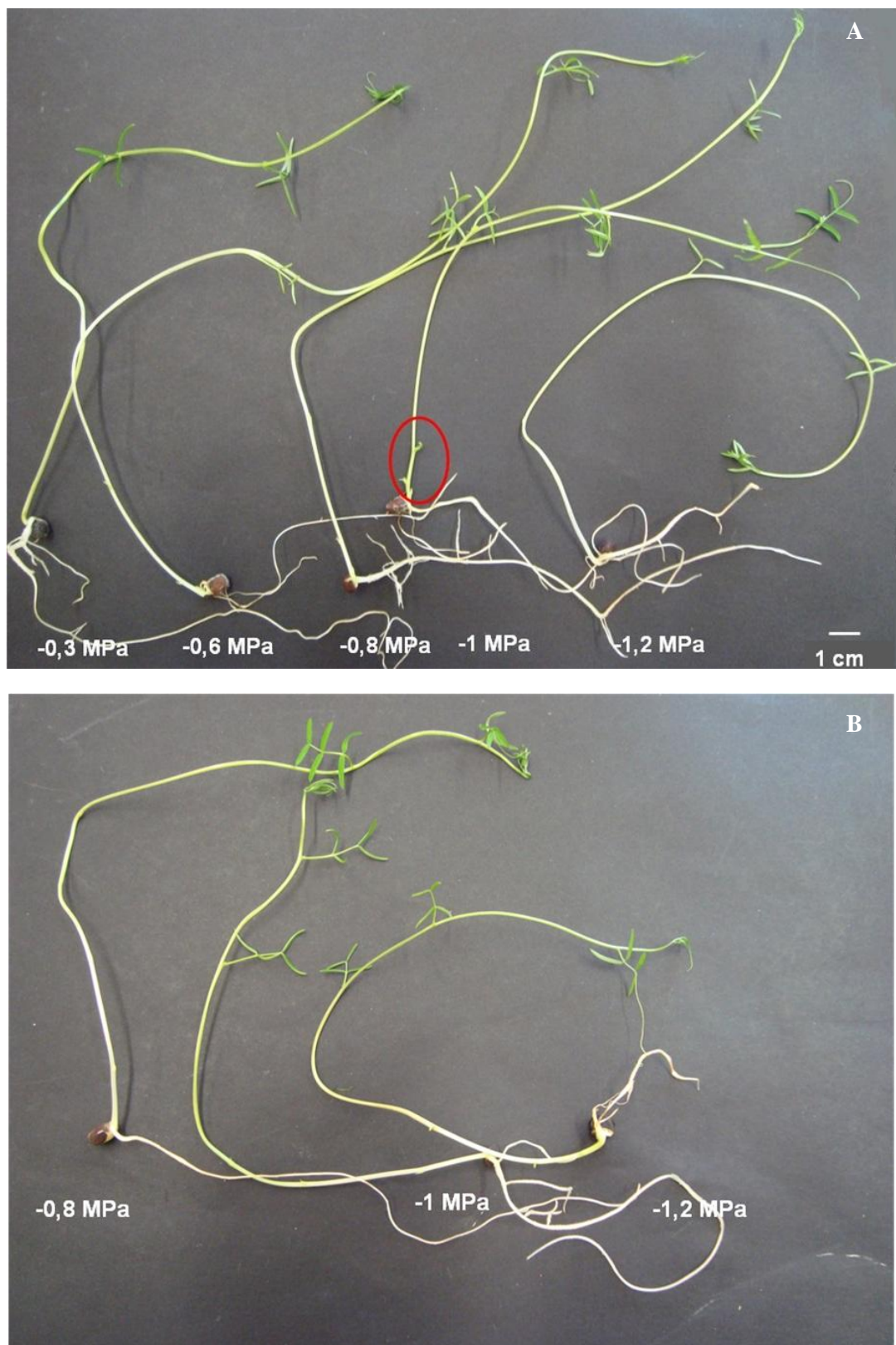


Figura 5.12. Recuperación de *V. dasycarpa* cv. Tulse F.C.A. A, sometidas a estrés hídrico (PEG); B, estrés salino (CINa) luego de 12 días de recuperadas. Círculo, brote de yemas perfilares.

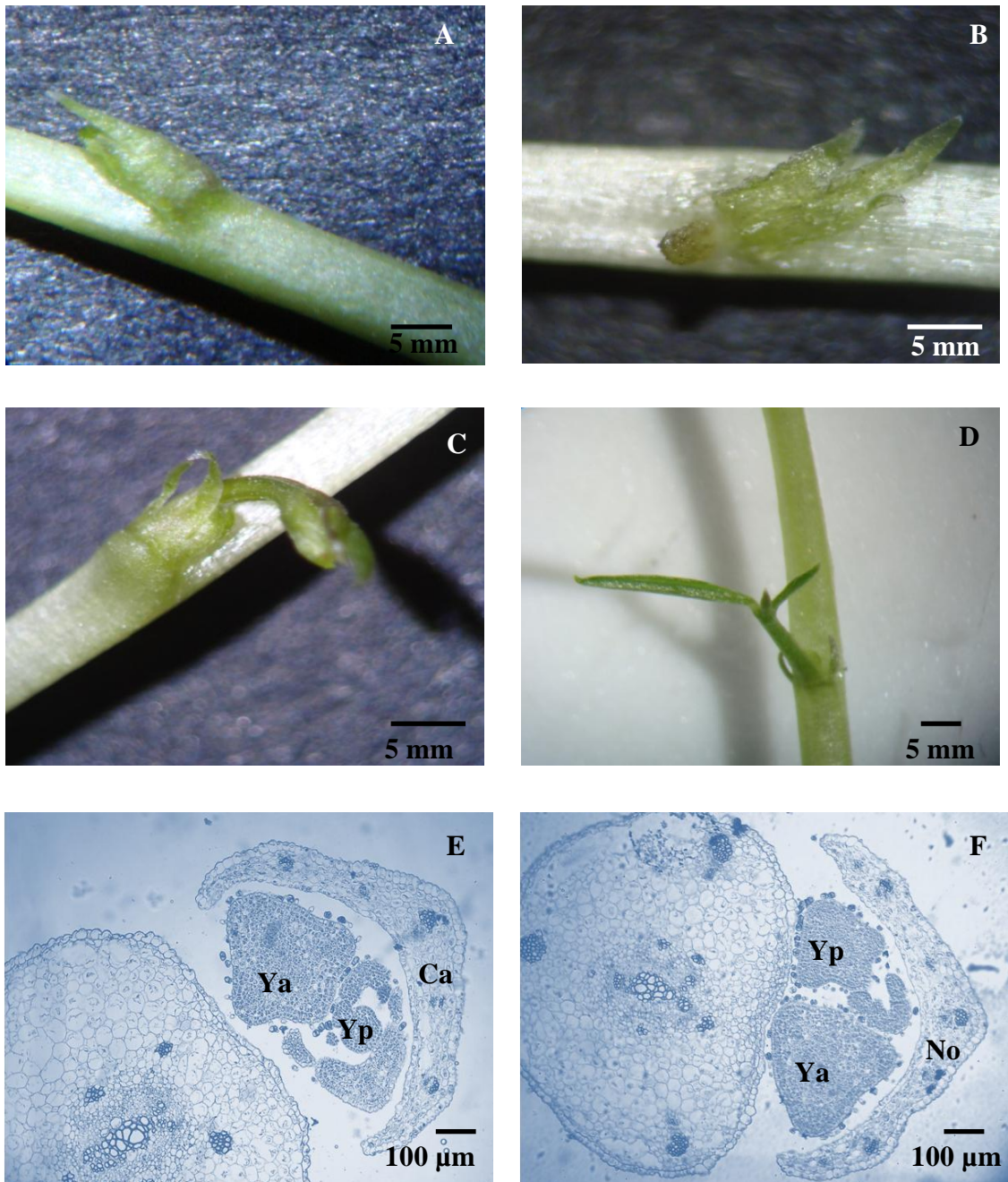


Figura 5.13. Tríades en axila de catafilos y nomofilos de *V. dasycarpa*. A, catafilo trilobado; B, tríades; C, detalle de la yema principal; D, yema principal originando ramificación; E y F, corte transversal del nudo del complejo axilar (yemas axilar y profilar); E, nivel primer catafilo; F, nivel de nomofilo. Ca, catafilo; No, nomofilo; Ya, yema axilar; Yp, yema profilar.

Morfología de las plántulas de semillas recuperadas

En la Figura 5.12 se muestra la comparación de la respuesta entre las plántulas provenientes de semillas luego de 12 días del inicio de la recuperación al estrés hídrico y salino. En algunas plántulas se observa el desarrollo de ramificaciones cuyo origen se determinó que partía de la axila de los catafilos (Figs. 5.12 A y 5.13).

Los estudios anatómicos muestran que tanto a nivel de catafilos como de nomofilos se encuentran complejos de yemas axilares. Estos complejos están conformados por la yema axilar y las yemas profílares fértiles, a partir de las cuales se desarrollan ramificaciones (Fig. 5.13). Esta característica concuerda con la citada para otras leguminosas por Tourn *et al.* (1996) y Perissé *et al.* (2014) en *Cologania boussonetii* (Balb.) DC., que pueden considerarse como una estrategia para el rebrote y por lo tanto para la supervivencia de la especie frente a factores adversos.

CONCLUSIONES

El estrés hídrico y salino afecta los parámetros de crecimiento del sistema radical y caulinar. El cultivar Tolse F.C.A. de *V. dasycarpa* es más sensible al crecimiento en condiciones de estrés hídrico simulado con PEG, comparado con el estrés salino con cloruro de sodio. Los resultados indican una respuesta en la que el sistema caulinar se ve menos afectado que el sistema radical en los tratamientos con cloruro de sodio. La respuesta a nivel anatómico más relevante frente al estrés hídrico es el engrosamiento de las paredes radiales y tangenciales internas de la endodermis, y en el cilindro central la escasa diferenciación por su diámetro entre los miembros de vaso del protoxilema y del metaxilema. Los engrosamientos de la endodermis se corresponden a nivel ultraestructural con el colapso las células endodérmicas y la acumulación de suberina. La plasmólisis de la corteza y el escaso desarrollo de la banda de Caspary son la respuesta más notable frente al estrés salino. A nivel de la ultraestructura, el poco desarrollo de la banda de Caspary se correlaciona con la degradación de suberina. Estas respuestas facilitan el movimiento apoplástico del agua hacia el sistema vascular. Las plántulas sometidas a estrés salino tienen un mejor comportamiento en comparación con las sometidas a estrés hídrico. El complejo de yemas axilares en los catafilos conforma un reservorio de meristemas apicales caulinares (MAC) para la recuperación frente al estrés.

CONCLUSIONES GENERALES

En la presente tesis se aportan características seminales y de la plántula del cultivar Tolse F.C.A. de *Vicia dasycarpa* que complementan descripciones realizadas por diversos autores, y que permiten su identificación tanto en ensayos de laboratorio como a campo. Se describe la relación entre la cubierta seminal y la importancia de las grietas en la lente, que posibilitan explicar el ingreso y avance del agua durante la imbibición. Dichas características permiten la imbibición del embrión, lo cual aseguraría la integridad de las membranas y una exitosa germinación. Por primera vez, se describe la presencia de dos pares de aréolas (pit y antipit) y sus características citológicas. Esto apoya la hipótesis respecto a su función como células de transferencia durante el proceso de embriogénesis, el llenado de la semilla, y la posterior hidratación.

El tipo de germinación criptohipógea y las características de la plántula normal, que incluye el complejo axilar -una yema axilar y las yemas profilares desarrolladas- en los catafilos (alguno de los cuales permanecen protegidos bajo el nivel del suelo), constituyen una ventaja adaptativa para su establecimiento en ambientes con distintos tipos de estrés.

La evaluación de la germinación en condiciones de estrés hídrico y salino, concluyó que el nivel mínimo de hidratación del 125% del peso fresco de la semilla, para alcanzar la germinación “*sensu stricto*”, es concordante con el citado para otras Fabáceas Papilionoideas. La disminución en la germinación en los niveles más altos de estrés hídrico y salino, se puede atribuir a que la semilla no alcanza dicho nivel de hidratación en la fase de imbibición, por deficiencia en la disponibilidad de agua. Esto puede conducir a la concentración de ROS, degradación o inactivación de enzimas, e inhibición de la germinación.

El estrés hídrico simulado con PEG, y el salino con cloruro de sodio afectaron la germinación y el crecimiento de las plántulas de *Vicia daycarpa*, y de forma más marcada en

la medida que disminuyó el potencial agua. El porcentaje de germinación resultó el indicador más sensible.

Con la aplicación del modelo de tiempo hídrico se corroboró la hipótesis planteada en relación a la mejor respuesta a la germinación de *Vicia dasycarpa* cv. Tolse F.C.A. en condiciones de estrés salino que en condiciones de estrés hídrico.

Los resultados obtenidos a partir del estudio de la ultraestructura, implican una relación entre el movimiento de agua y nutrientes en las raíces vía apoplasto y simplasto, y la barrera que representa la suberina en la endodermis. Se reporta por primera vez para este cultivar la deposición de suberina en la endodermis como respuesta al estrés hídrico, en contraposición con la degradación de la suberina como respuesta al estrés salino. La primera respuesta permite explicar el retraso en la germinación frente al estrés hídrico y la segunda, la mayor tasa de germinación y crecimiento frente al estrés salino.

En los casos de bajos potenciales agua simulados por PEG, se produciría un efecto osmoprotector, lo cual explicaría la significativa recuperación al disminuir el estrés hídrico. Por otro lado, con bajos potenciales agua por estrés salino, es posible un elevado porcentaje de germinación, pero con bajo porcentaje de recuperación en caso de cesar el estrés.

El hecho de que el cultivar Tolse F.C.A. de *Vicia dasycarpa* superó el 60% de germinación tanto en condiciones de estrés hídrico y salino con potenciales agua de hasta -0,8 MPa, pone en evidencia el prometedor futuro de este cultivar para ser utilizado como forrajera y/o abono verde, en regiones con estos problemas, y específicamente en la región centro y noroeste de la provincia de Córdoba.

Se respalda la hipótesis planteada en esta investigación sobre las respuestas morfo-fisiológicas de la germinación de *Vicia dasycarpa* Ten. cv. Tolse F.C.A en condiciones de estrés hídrico y salino.

Las investigaciones de las respuestas morfológicas y fisiológicas bajo estrés hídrico y salino en la fase de germinación y crecimiento temprano de la plántulas son

fundamentales para la comprensión de las características y la capacidad de recuperación en dichos estadíos tempranos, hasta el punto de entender la baja implantación de plántulas o de resiembra.

El estrés hídrico afecta en gran medida a la germinación, pero la intensidad de la respuesta depende de la especie, del estadío y de la duración del estrés. De aquí, la necesidad de abordar estudios interdisciplinarios en los cuales la morfo-fisiología puede guiar el trabajo de investigadores y fitomejoradores en la búsqueda y evaluación de cultivares de ésta y otras especies de leguminosas tolerantes al estrés hídrico y salino.

La importancia de los aportes de esta investigación radica en su aplicación en planes de mejoramiento, constituyendo una herramienta útil para evaluar cultivares tolerantes a estrés hídrico y salino, y proponer innovaciones que permitan mejorar la actividad agrícola.

Este estudio representa una contribución para la comprensión de las respuestas morfo-fisiológicas al estrés hídrico y salino de una leguminosa con un alto valor ya que aporta forraje durante el período otoño-inverno-primaveral.

Futuras líneas de investigación

Sería importante estudiar las respuestas morfo-ecofisiológicas en estadíos más avanzados del cultivo.

Dadas las respuestas adaptativas morfo-fisiológicas del cultivar es posible identificar marcadores que permitan fundamentar la respuesta adaptativa.

Desde el punto de vista tecnológico y agronómico, teniendo en cuenta que el Semillero “Los algarrobos” está interesado en comercializar el cultivar; se propone evaluar los lotes de semilla en relación a la respuesta al estrés hídrico y salino.

Desde el punto de vista Morfo- Fisiológico, sería beneficioso extender las investigaciones a otras leguminosas de interés.

BIBLIOGRAFÍA CITADA

- Aiazzi M.T., Carpane P.D., Argüello J.A. and Piotto B. 2004. Salt tolerance at the germination stage of seeds of *Atriplex cordobensis* from different provenances. *Seed Sci. & Technol.* 32:43-52.
- Aiazzi M.T., Di Rienzo J.A. and Sosa L. 2009. Effects of different salts on the germination and early seedling growth of *Atriplex cordobensis* Gandoger et Stuckert. *Seed Sci. & Technol.* 37: 17-24.
- Akinci Ş. and Lösel D.M. 2012. Plant water-stress response mechanisms. En: *Water Stress*. Ismail M.d. Mofizur Rahman & Hiroshi Hasegowa. pp 17-39. Disponible en: <http://www.intechopen.com/books/water-stress/plant-water-stress-response-mechanisms>.
- Argüello J.A., Perez M.A., Aiazzi M. T., Romano. A.S. 1992. Protocolo para la Evaluación de líneas de maní tolerantes y susceptibles a la sequía (selección de sistemas de cultivo y de osmolito para la germinación). F5130, 15 pág. Biblioteca de la Fac. Cs. Agropecuarias U.N.C
- Atabayeva S., kmaral Nurmahanova A., Minocha S., Ahmetova A., Kenzhebayeva S., Aidosova S., Nurzhanova A, Zhardamalieva A., Asrandina S., Alybayeva R. and Li T. 2013. The effect of salinity on growth and anatomical attributes of barley seedling (*Hordeum vulgare* L.). *African Journal of Biotechnology* 18: 2366-2377.
- Basconsuelo S., Weberling F. and Kraus T. 2002. Tranzition zone between root and stem vascular system in seedlings of members of the tribe Phaseolae (Fabaceae). *Feddes repertorium* 113 (3-4): 224-230.
- Baskin C.C. and Baskin J.M. 1998. Ecologically meaningful germination studies. En: *Seeds, ecology, biogeography and evolution of dormancy and germination*. Ed. Academic Press, USA. pp. 5-26.
- Berkart O. and Briske D.D. 1982. Water potential evaluation of three germination substrates utilizing polyethylene glycol. *Agron. J.* 74: 518-521.
- Bewley J.D. and Black M. 1994. *Seeds. Physiology of Development and Germination*. 2nd Ed. Plenum Press. New York. 445 pp.
- Bhatt R. M. and. Srinivasa Rao N.K. 1987. Seed germination and seedling growth responses of tomato cultivars to imposed water stress. *J. Hort. Sci.* 62 (2):221-225.
- Boeswinkel, F.D. and Bouman F. 1984. The seed structure. En: *Embryology of Angiosperms*. Johri B. M. Springer Verlag, Berlin. pp.567-610.
- Bradford K. 1995. Water relations in seed germination. En: *Seed development and germination* J. Kigel & G. Galili. Marcel Dekker Inc, New York. 351-396 pp.
- Bradford K.J. and Still D.W. 2004. Applications of hydrottime analysis in seed testing. *Seed Technology* 26: 75-85.
- Brown A. y Pacheco S. 2006. Propuesta de actualización del mapa ecoregional de la Argentina. En: *La situación ambiental argentina 2005*. Brown A., Martínez Ortíz

- U., Acerbi M. y Corcuera J. Fundación Vida Silvestre Argentina, Bs As, Argentina. 28-31 pp.
- Brown A. and Rieseberg L. 2006. Abiotic Stress. En: Enhancing the use of crop genetic diversity to manage abiotic stress in agricultural production systems. D. Jarvis, I. Mar and L. Sears editors. Proceedings of a workshop. 23-27 may 2005, Budapest, Hungary. International Plant Genetic Resources Institute, Rome, Italy. 97 pp.
- Burgos J.J. y Vidal A. 1951. Los climas de la República Argentina según la nueva clasificación de Thornthwaite, *Meteoros* 1(1): 3-32.
- Burkart A. 1952. Las Leguminosas Argentinas silvestres y cultivadas. Ed. Acme Agency, Buenos Aires, Argentina. 569 pp.
- Cabral de Melo H. 2011. Espessamento em fi de parede celular. *Hoehnea* 38(1):1-7.
- Cabrera A.L. 1971. Fitogeografía de la República Argentina. *Bol. Soc. Argent. Bot.*, 14: 1-42.
- Cabrera A.L. 1976. Regiones Fitogeográficas argentinas En: Enciclopedia Argentina de Agricultura. y Jardinería, Editorial ACME, Buenos Aires, 2a ed., 2(1):1- 85.
- Carámbula M. 1977. Producción de semillas de plantas y manejo de pasturas sembradas. Editorial Agropecuaria Hemisferio Sur, Bs As-Argentina. 464 pp.
- Carrasco Ríos L.V. 2004. Salinidad: homeostasis iónica y acuaporinas. *IDESIA (Chile)*, 22 (2): 61-68.
- Casini C. 1990. Seed Imbibitional Studies Related to Seedcoat and Seed Size in Soybean *Glycine max* (L.) Merrill. Genotypes With Different Levels of Permeability. Tesis Ph.D. Mississippi State University. Mississippi State. USA.160 pp.
- Céccoli G., Ramos J.C., Ortega L.I., Acosta J.M. and Perreta M.G. 2011. Salinity induced anatomical and morphological changes in *Chloris gayana* Kunth roots. *Biocell* 35: 9-17.
- Chen T., Cai X., Wu X., Karahara I., Schreiber L. and Lin J. 2011. Casparian strip development and its potential function in salt tolerance. *Plant Signaling & Behavior* 6:10, 1499-1502.
- Coraglio J.C., Vieyra C.A. y Nienstedt E.F. 2001. Obtención del cultivar "Tolse F.C.A." de *Vicia dasycarpa* Ten. *Agriscientia* 18: 59-62.
- Cordero S.R.A. y Di Stefano G.J.F. 1990. Efecto del estrés osmótico sobre la germinación de semillas de *Tecoma stans* (Bignoniaceae). *Rev. Biol. Trop.* 39 (1):107-110.
- Corner E.J. 1976. The Seeds of Dicotyledons, vols. I & II, Cambridge. University Press, Cambridge. 564 pp.
- Date R.A. and Halliday J. 1980. Relationships between *Rhizobium* and Tropical Forage Legumes. En: Advances en Legume Science. Summerfield R.J. and Bunting AH. (Eds.). Royal Botanic Gardens UK. 667 pp. 597-601.
- De R. and Kar R.K. 1995. Seed germination and seedling growth of mung bean (*Vigna radiata*) under water stress induced by PEG-6000. *Seed Sci. & Technol.* 23: 301-308.
- Degenhardt B. and Gimmler H. 2000. Cell wall adaptations to multiple environmental stresses in maize roots. *J. Exp. Bot.* 51(344):595-603.

- De Villiers A; Van Rooyen M., Theron G. and Van der Venter H. 1994. Germination of three namaqualand pioneer species, as influenced by salinity, temperature and light. *Seed Sci. & Technol.* 22, 427-433.
- De Vogel E.F. 1979. Morphological types in dicot seedlings, with reference to their origin. *Bulletin Societé Botanica Française* 126. Actualalités Botaniques, vol 3: 173- 182.
- De Vogel E.F. 1980. Seedling of Dicotyledons: structure, development, types. Centre for Agricultural Publishing and Documentation (PUDOC), Wageningen, Netherlands. 465 pp.
- Duke J.A. and Polhill R.M. 1981. Seedlings of Leguminosae. En: *Advances in Legume Systematics*. Polhill y P.H. Raven. Royal Botanic Gardens, Kew, U.K. pp. 941-950.
- Dupont S., Beney L., Ritt J.F., Lherminier J., Gervais P. 2010. Lateral reorganization of plasma membrane is involved in the yeast resistance to severe dehydration. *Biochimica et Biophysica Acta* 975-985.
- Emmerich W.E. and Hardegree D.P. 1991. Seed germination in polyethylene glycol solution: effects of filter paper exclusion and water vapor loss. *Crop. Sci.* 31: 454-458.
- Endo Y. and Ohashi H. 1998. The features of cotyledon areoles in Leguminosae and their systematic utility. *American Journal of Botany* 85 (6): 753-759.
- Enstone D.E., Peterson C.A. and Ma F. 2003. Root endodermis and exodermis: structure, function, and responses to environment. *J. Plant Growth Regul.* 21(4):335-351.
- Esau K. *Anatomía de las plantas con semilla*. 1982. Hemisferio Sur, Bs.As. Argentina. 511 pp.
- Evert, R.F. 2008. *Esau Anatomía Vegetal, Meristemas, células y tejidos de las plantas: su estructura, función y desarrollo*. Ediciones Omega, Barcelona, España, 3ra Edición. 614 pp.
- Fahn A. and Cutler D.F. 1992. *Xerophytes*. Ed. Gebrüder Borntraeger, Berlin, Germany. 174 pp.
- Fatemi S.N. 2014. Germination and seedling growth in primed seeds of sunflower under water stress. *Annual Research & Review in Biology* 4(23): 3459-3469. Disponible en: www.sciencedomain.org.
- Fernández-García N., López-Berenguer C. and Enrique Olmos E. 2014. Role of phi cells under abiotic stress in plants. En: *Root Engineering, Soil Biology*. A. Morte and A. Varma 23-36. pp. Disponible en: © Springer-Verlag Berlin Heidelberg.
- Flowers T.J. 2004. Improving crop salt tolerance. *J. Exp. Bot.* 55: 307-319.
- FAO, 1989. *La agricultura mundial hacia el año 2000*. Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación. Madrid, 471 pp.
- Galussi A.A. 2011. *Estudios morfológicos y fisiológicos de la dormición de semillas de Medicago sativa l. (alfalfa) cv. Baralfa 85*. Tesis Doctoral. Universidad Nacional de Córdoba, Córdoba, Argentina. 86 pp.

- García-Morales S., Gomez-Merino F.C., Trejo-Tellez L., Herrero-Cabrera E.B. 2013. Factores de transcripción involucrados en respuestas moleculares de las plantas al estrés osmótico. *Rev. Fitotec. Mex.* 36 (2): 105-115.
- Gil I.A.A., Duver Rojas S. y González M.A. 1985. Comportamiento de cinco Leguminosas forrajeras como cobertura de áreas fuertemente erodadas del pie de monte de la Cordillera Occidental en el Valle del Cauca. *Acta Agronómica* 35/2: 42-51.
- Gil N. y Vejar K.C. 1965. *Botánica Agrícola*. Editorial Acribia. Zaragoza, España, 562 pp.
- Glave A.E. 1988. Manejo de suelos y agua en la región semiárida pampeana. En: *Erosión: sistemas de producción, manejo y conservación del suelo y del agua*. Fundación Cargill. Buenos Aires, Argentina. pp 1-21.
- Golberg A.D., Ruíz M.A., Quiroga A., Fernández O.A. 2011. ¿Qué le sucede a un cultivo cuando no llueve? INTA Anguil La Pampa. 93 pp.
- Gunn C.R. 1970. A key and diagrams for the seeds of one hundred species of *Vicia* (Leguminosae). *Proc. Internat. Seed Test. Assoc.* 35:773-790.
- Gunn C.R. 1981. Seeds of Leguminosae. En: *Advances in Legume systematics* R. M. Polhill E. H. Raven (eds). Royal Botanical Garden. Kew. U.K. pp. 913-925.
- Hacker J.B., Glatzle A. and Vanni R. 1996. Paraguay-a potential source of new pasture legumes for the subtropics. *Trop. Grasslands* 30: 273-281.
- Hadas A. 1976. Water uptake and germination of Leguminous seeds under changing external water Potential in osmotic solutions. *J. Exp. Bot.* 98: 480-489.
- Hadas A. 1977. A simple laboratory approach to test and estimate seed germination performance under field conditions. *Agron. J.* 69: 582-588.
- Hadas A. and Russo D. 1974. Water uptake by seeds as affected by water stress, capillary conductivity and seed-soil water contact. I Experimental study. *Agron. J.* 66: 643-646.
- Hadiarto T. and Tran L.S. 2011. Progress studies of drought-responsive genes in rice. *Plant Cell Rep.* 30: 297-310.
- Haffani S., Mezni M., and Chaïbi W. 2014. Agronomic performances of three vetch species growing under different drought levels. *Chilean Journal of Agricultural Research* 74 (3): 263-272.
- Halliday J. 1979. Field responses by tropical forage legume to inoculation with *Rhizobium*. En: *Production and Utilization of Forages in Acid, Infertile Soils*. CIAT. Colombia. P.H. Sánchez y L.E. Tergas (eds.) 123-137 pp.
- Hammeed M., Nawaz T., Ashraf M., Naz N., Batool R. Ahmad M.S.A., Riaz A. 2013. Physioanatomical adaptations in response to salt stress in *Sporobolus arabicus* (Poaceae) from the Salt Range, Pakistan. *Turkish Journal of Botany* 37: 715-724.
- Hartung W., Sauter A. and Hose E. 2002. Abscisic acid in the xylem: where does it come from, where does it go to? *Journal of Experimental Botany* 53: 27-32.
- Hassan A.E. and Heneidak S. 2006. Stem anatomy and nodal vasculature of some Egyptian *Vicia* species (Faboideae-Fabaceae). *Pakistan Journal of Biological Sciences* 9: 2556-2563.

- Hayward H.E. 1953. Capítulo XII Leguminosae. En: Estructura de las plantas útiles. Editorial ACME, Buenos Aires. pp. 340- 371.
- Hegarty T.W. 1978. The physiology of seed hydration and dehydration and the relation between water stress and the control of germination. *Plant Cell Environ* 1: 101-119.
- Heydecker W. 1969. The vigour of seeds - a review. *Proc. Int. Seed Test. Assoc.* 34:201-219.
- Hu X.W., Wang Y.R., Wu Y.P. and Baskin C.C. 2009. Role of the lens in controlling water uptake in seeds of two Fabaceae (Papilionoideae) species treated with sulphuric acid and hot water. *Seed Science Research* 19: 73-80.
- Hunter J.R. and Erickson A.E. 1952. Relation of seed germination to soil moisture tension. *Agron. J.* 44: 107-109.
- InfoStat 2009. *Infostat versión 2009*. Grupo InfoStat, F.C.A. Universidad Nacional de Córdoba, Argentina. <http://www.agro.unc.edu/InfoStat/manual.html>.
- INTA. Panorama edafológico de Córdoba. Plan mapa de suelos de Córdoba. 1993. Instituto nacional de tecnología agropecuaria, Ministerio de Agricultura Ganadería y Recursos Naturales. 139 pp.
- INTA Manfredi. 2011. Información meteorológica. Disponible en: <http://inta.gob.ar/documentos/lluvias-informacion-meteorologica-de-la-e.e.a.-manfredi/>
- ISTA. 2003. *ISTA Handbook on Seedling Evaluation*. 19-1-19-9. International Seed Testing Association, Zurich, Switzerland.
- ISTA. 2004. *International Rules for Seed Testing*. International Seed Testing Association, Zurich, Switzerland. 333 pp.
- ISTA. 2007. List of stabilized plant names 5 th edition. http://www.seedtest.org/upload/prj/product/ISTA_list_of_stabilized_Plant_Names_Ed_5.pdf.
- Jamian S.S., Mehrani S., Asilan K.S., Tabrizi A.T., Alireza Goharian A. 2014. Responses of seedling growth and germination parameters in three medicinal plants under drought stress. *Intl J Agri Crop Sci.* Vol. 7 (4), 191-195.
- Jacobsen J.V. 1984. The seed germination. En Johri B.M. *Embryology of Angiosperm*. Springer-Verlag, Berlin. pp. 611-640.
- Jaleel C.A., Manivannan P., Wahid A., Farooq M., Somasundaram R. and Panneerselvam R. 2009. Drought stress in plants: a review on morphological characteristics and pigments composition. *Int. J. Agric. Biol.* 11: 100–105.
- Jarsún B., Gorgas J.A., Zamora E., Bosnero H., Lovera E., Ravelo A., Tassile J.L. 2006. Recursos Naturales de la provincial de Córdoba Los suelos. Gobierno de Córdoba. Agencia Córdoba Ambiente-INTA Manfredi. J.A. Gorgas y J.L.Tassile. 612 pp.
- Jones H.G. 1993. Drought tolerance and water-use efficiency. Water deficits plant responses from cell to community. J.A.C. Smith, H. Griffiths. BIOS Sci. Ltd. Oxford. 193-203 pp.

- Karlin U., Catalan L. y Coirini R. 1994. La naturaleza y el hombre en el Chaco seco. Colección nuestro ecosistemas. Proyecto GTZ-Desarrollo Agroforestal en comunidades rurales del Noroeste Argentino. Salta, Argentina. 163 pp.
- Kaur H. and Pal A. 1989. Structure, anatomy and spermoderm pattern of seeds in some *Vicia* species (Papilionoideae). *Phytomorphology* 39 (4): 363-370.
- Kent J., Bradford K.J. and Still D.W. 2004. Applications of hydrotime analysis in seed testing. *Seed Technology* 26 (1): 75:85.
- Khan M.H. and Panda S.K. 2008. Alterations in root lipid peroxidation and antioxidative responses in two rice cultivars under NaCl-salinity stress. *Acta Physiol Plant* 30, 91-89.
- Kirkbride J.H. Jr., Gunn C.R. and Weitzman A.L. 2003. Fruits and seeds of genera in the subfamily Faboideae (Fabaceae). Technical Bulletin n°1890. 1.212 p. United States Department of Agriculture. Agricultural Research Service. Washington DC.
- Koizumi M. and Kano H. 2014. Lens: Water Channel for Dry Broad Bean Seeds at Germination Observed by Micro-Magnetic Resonance Imaging. *American Journal of Biology and Life Sciences* Vol. 2, (2): 37-40.
- Koller D. 1972. Environmental control of seed germination. En: *Seed Biology*. Kozlowski T.T. Vol II. Academic. Press. U.S.A. 2-101 pp.
- Kretschmer A.E. Jr. 1962. Annual clovers and perennial legumes that may be adapted to south Florida environment. *Soil Crop. Sci. Soc. Fla. Proc.* 22: 199-214.
- Kupicha F.K. 1976. The infrageneric structure of *Vicia*. *Notes Royal Botanic Garden Edinburgh* 34: 287-326.
- Kupicha F.K. 1981. Tribe 21. Vicicieae. En: *Advances in legume systematic*. R M. Polhill & P.H. Raven (eds.) Royal Botanic Gardens, Kew, U.K. 377-381.
- Kyle J.H. 1959. A study of the relationship of the micropyle opening to hard seeds in Great Northern beans. M.Sc. thesis University. of Idaho. Moscow. Citado por Miklas, P. N., Townsend C. E & S. L. Ladd. 1987. *Crop Sci.* 27: 766-722.
- Lackey J.A. 1981. Tribe 19. Phaseoleae DC. (1825). En: *Advances in Legume Systematics*, Polhill, R.M., Raven, P.H., vol. 1. Royal Botanic Gardens, Kew, UK. pp. 301–327.
- Lackey J.A. 2007. Cotyledon areoles in the Fabaceae subtribe clitoriinae. *J. Bot. Res. Inst. Texas* 1 (2):1101-1118.
- Lafond G.P. and Baker R.J. 1986. Effects of temperature, moisture stress, and seed size on germination of nine spring wheat cultivars. *Crop. Sci.* 26: 563-567.
- Landridge P., Paltridge N. and Fincher G. 2006. Functional genomics of abiotic stress tolerance in cereals. *Briefings in Functional Genomics and Proteomics* 1(4):343-354.
- Larcher W. 2003. *Physiological plant ecology. Ecophysiological and stress physiology of functional groups*. 4th Edition. Springer-Verlag, Berlin-Heidelber. 534 pp.
- Laux T. and Jürgens G. 1997. Embryogenesis: a new start in life. *The Plant Cell* 9: 989-1000.

- Le Deunff Y., Ballot, S. and Toubou C. 1989. Hydratation des graines de lupin blanc et relargage des électrolytes. *Seed Sci. & Technol.* 17: 325-340.
- Lee S.B., Jung S.J., Go Y.S., Kim H.U., Kim J.K., Hong-Joo Cho H.J., Park O.K. and Suh M.C. 2009. Two *Arabidopsis* 3-ketoacyl CoA synthase genes, KCS20 and KCS2/DAISY, are functionally redundant in cuticular wax and root suberin biosynthesis, but differentially controlled by osmotic stress. *The Plant Journal* 60: 462-475
- Leidy E.O. y Pardo J.M. 2002. Tolerancia de los cultivos al estrés salino. *Revista de investigaciones de la Facultad de Ciencias agrarias*. Disponible en: <http://www.fcagr.unr.edu.ar/Investigacion/revista/rev2/5.htm>.
- Lersten N.R. 1981. Testa topography in Leguminosae, subfamily Papilionoideae. *Proc. Iowa. Acad. Sci.* 88 (4): 180-191.
- Lersten N.R. 1982. Tracheid bar and vestured pits in legume seeds (Leguminosae: Papilionoideae). *American Journal of Botany* 69:98-107.
- Lersten N.R. and Gunn Ch. R. 1982. Testa characters in tribe Viceae, with notes about, Abreae, Cicerae, and Trifolieae (Fabaceae). *United States of Agriculture, Technical Bulletin N°1667*. 40 pp.
- Levitt J. 1980. Responses of plants to environmental stresses. Vol II. Water, radiation, salt and other stresses, Academic Press, New York. 607 pp.
- Li H., Li X., Zhang D., Liu H. and Guan K. 2013. Effects of drought stress on the seed germination and early seedling growth of the endemic desert plant *Eremosparton songoricum* (fabaceae). *EXCLI Journal* 12:89-101.
- Lichtenthaler H.K. 2004. El estrés y la medida del estrés en las plantas. En: *La ecofisiología vegetal. Una ciencia de síntesis*. Thomson Editores. Spain. 59-11 pp.
- Longstreth D.J. and Nobel P.S. 1979. Salinity effects on leaf anatomy consequences for photosynthesis. *Plant Physiol.* 63: 700-703.
- López Bellido L. 1994. The role of legumme crops in sustainable agriculture. The case of lupin. En: *Advances in Lupin Research*. Neves-Martins & M. L. Beirão Da Costa (eds.) Instituto superior de Agronomía, ISA Press, Lisboa, pp. 272-279.
- López Bellido L. 2006. El papel de las leguminosas en la sostenibilidad de la agricultura. En: *Nuevos retos y oportunidades de las leguminosas en el sector agroalimentario español*. M. de los Mozos, M.J. Jimenez Alvear, M.F. Rodríguez-Conde y R. Sánchez Vioque (eds.) Conserjería de agricultura, Junta de comunidades de Castilla-La Mancha, pp. 29-50.
- López-Pérez L., Fernández-García N., Olmos E. and Carvajal M. 2007. The phi thickening in roots of broccoli plants: an acclimation mechanism to salinity? *Int. J. Plant Sci.* 168(8):1141-1149.
- Lovey R.J., Perissé P., Vieyra C, Coraglio J.C. 2009. Caracterización de semilla, germinación y plántula de *Cologania broussonetii* (Balb.) DC. *Phyton* 79: 5-10.
- Ma F., Cholewa E., Mohamed T., Peterson C.A. and Gijze M. 2004. Cracks in the palisade cuticle of soybean seed coats correlate with their permeability to water. *Annals of Botany* 94: 213-228.

- McDonald M.B.Jr., Vertucci C.W. and Ross E.E. 1988a. Seed coat regulation of soybean seed imbibition. *Crop Sci.* 28:9873-992.
- McDonald M.B.Jr., Vertucci C.W. and Ross E.E. 1988b. Soybean seed imbibition: water absorption by seed parts. *Crop Sci.* 28:993-997.
- Maggio A., Hasegawa P.M., Bressan R.A., Consiglio M.F. y Joly, R.J. 2001. Unravelling the functional relationship between root anatomy and stress tolerance. *Australian Journal of Plant Physiology* 28: 999-1004.
- Manning J.C. and van Staden J. 1987a. The systematic significance of testa anatomy in the Leguminosae-an illustrated survey. *S. Afr. Tydskr. Plantk.* 53 (3): 210-230.
- Manning J.C. and J. van Staden. 1987b. The role of the lens in seed imbibition and seedling vigour of *Sesbania punicea* (Cav.) Benth. (Leguminosae: Papilionoideae). *Ann. Bot.* 59: 705-713.
- Mano J. 2002. Early events in environmental stresses in plant- induction mechanisms of oxidative stress. En: oxidative stress in plants. Ed. Inzé D., Van Montagu, M. Taylor and Francis London UK. pp 217-246.
- Marin P.D., Boza P., Merukov L.J., Krstić B., Petković B. and Veljić M. 1998. Seed sculpturing of selected European *Vicia* L. species (Fabaceae) and their taxonomical evaluation. *Seed Sci. & Technol.* 26: 17-32.
- Martin A.C. 1946. The comparative internal morphology of seeds. *The American Midland Naturalist* 36: 513-660.
- Mejía M. 1984. Nombres Científicos y Vulgares de Especies Forrajeras Tropicales. Cali. Colombia: Centro Internacional de Agricultura Tropical (Eds.). 75 pp.
- Meyer C.J., Steudle E., and Peterson C.A. 2007. Patterns and kinetics of water uptake by soybean seeds. *Journal of Experimental Botany* 58 (3):717-732.
- Michel B. 1983. Evaluation of the water potentials of solutions of polyethylene glycol 8000 both in the absence and presence of other solutes. *Plant Physiol.* 72: 66-70.
- Mohamed-Yasseen M., Barringer S.A., Splittstoesser W.E. and Costanza S. 1994. The Role of Seed Coats in Seed Viability. *Bot. Rev.* 60(4): 426-439.
- Mohammadizad H.A., Khazaei I., Ghafari M., Sinehsar M.F.F., Barzegar R. 2013. Effect of salt and drought stresses on seed germination and early seedling growth of *Nepeta persica*. *Intl. J. Farm & Alli Sci.* Vol. 2 (21): 895-899.
- Momayezi M.R., Zaharah A.R. and Hana M.M. 2012. The effects of cation ratios on root lamella suberization in rice (*Oryza sativa* L.) with contrasting salt tolerance. *International Journal of Agronomy*. Disponible en: <http://www.hindawi.com/journals/ija/2012/769196/ref/>
- Moreno-Fonseca L.P. 2009. Respuesta de las plantas al estrés por déficit hídrico. Una revisión. *Agronomía Colombiana International* 27(2), 179-191.
- Muir J. and Pitman W. 1991. Response of *Desmanthus virgatus*, *Desmodium heterocarpum* and *Galactia elliottii* to defoliation. *Trop. Grass.* 25: 291-296.
- Muir J., Pitman W. and Tanner G. 1990. *Galactia*, a native legume genus with grazing and wildlife value in Florida. *Soil Crop Sci. Soc. Fla. Proc.* 49: 103-106.

- Munsell® soil color charts. 2000. Revised washable edition. Gretagmacbeth. New Winsor, US. 55 pp.
- Munns R. 2002. Comparative physiology of salt and water stress. *Plant, Cell and Environment* 25: 561-569.
- Munns R. and Tester M. 2008. Mechanisms of salinity tolerance. *Annu. Rev. Pl. Biol.* 59: 651-681.
- Murillo-Amador B., Lopez-Aguilar R., Kaya C., Larrinaga-Mayoral J. and Flores-Hernandez A. 2002. Comparative effects of NaCl and polyethylene glycol on germination, emergence and seedling growth of cowpea. *J. Agronomy & Crop Science* 188: 235-247.
- Nadal-Moyano S., Moreno-Yagüela M.T., Cubero-Aslmeron J.I. 2004. Las leguminosas grano en la agricultura moderna. Ediciones Mundi-Prensa, Madrid, España, 318 pp.
- Nawaz T., Hameed, M., Ashraf M., Batool S., Naz N. 2013. Modifications in root and stem anatomy for water conservation in some diverse blue panic (*Panicum antidotale* Retz.) ecotypes under drought stress. En: *Arid Land Research and Management*, 27:286–297, DOI: 10.1080/15324982.2012.727947. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1080/15324982.2012.727947>.
- Nawrath C. Schreiber L., Franke R.B., Geldner N., Reina-Pinto J.J. and Kunst L. 2013. Apoplastic diffusion barriers in Arabidopsis. En: *The Arabidopsis Book*. The American Society of Plant Biologists. Disponible en <http://www.bioone.org/doi/full/10.1199/tab.0167>. Activo agosto 2014.
- O' Brien T.P., Mc Cully M.E. 1981. The study of plant structure: principles and selected methods. Termarcaphy. Melbourne. 352 pp.
- Pedrol N., Gonzalez L. y Reigosa M.J. 2006. Capter 9. Allelopathy and abiotic stress. En: *Allelopathy a physiological process with ecological implications*. M.J. Reigosa, N. Pedrol y L. Gonzalez. Springer, Netherlands. 171-209 pp.
- Peña-Valdivia C.B., Sánchez-Urdaneta A.B., Meza Rangel J., Juárez Muñoz J., García-Nava R. y Celis Velázquez R. 2010. Anatomical root variations in response to water deficit: wild and domesticated common bean (*Phaseolus vulgaris* L.), *Biol Res* 43: 417-427.
- Pérez-Molphe-Balch E., Gidekel M., Segura-Nieto, M., Herrera-Estrella, L. and Ochoa-Alejo N. 1996. Effects of water stress on plant growth and root proteins in three cultivars of rice (*Oriza sativa* L.) with different levels of drought tolerance. *Physiol. Plant* 96: 284-290.
- Perissé P.1997.Caracterización morfológica de la cubierta seminal de *Lupinus albus* L. y *Lupinus angustifolius* L. y su relación con la germinación. Tesis de Maestría Universidad Nacional de Córdoba, Córdoba, Argentina. 87pp.
- Perissé P., Aiazzi M.T and Planchuelo A.M. 2002. Water uptake and germination of *Lupinus albus* L. and *L. angustifolius* L. under water stress. *Seed Sci. & Technol.* 30-2: 289-298.
- Perissé P. and Planchuelo A.M. 2004. Seed coat morphology of *Lupinus albus* L. and *L. angustifolius* L. in relation to water uptake. *Seed Sci. & Technol.* 32: 69-77.

- Perissé P., Lovey R.J., Molinelli M.L. y M. Scandaliaris. 2014. Estrategias y tácticas de supervivencia de *Cologania broussonetii* (Balb) DC (fabaceae-faboideae). *Phyton* 83: 275-281.
- Perreta M.G. y Vegetti A.C. 2005. Patrones estructurales en las plantas vasculares una revisión. *Gayana Botánica* 62: 9-19.
- Perrino P., Yarwood M., Hanelt P. and Polignano G.B. 1984. Variation characters in selected *Vicia* species. *Kulturpflanze* 32: 103-122.
- Pesqueira J., Fracaroli V., Vértiz P., Andrés A., Rosso B., Ruiz O.A y Pieckenstain F. 2007. Evaluación de parámetros fisiológicos, morfológicos y bioquímicos de la respuesta al estrés salino de diferentes accesiones de *Lotus tenuis*. *Lotus Newsletter* 37 (1): 28-29.
- Pessaraki M. 2011. Responses of green beans (*Phaseolus vulgaris* L.) in terms of fry matter production, nitrogen uptake, and water absorption under salt-stress conditions. En: Hand book of plant and crop stress. Pessaraki M. (ed.) CRC Press, Boca Raton, Florida USA, pp. 879-962.
- Pessaraki M. and Szabolcs I. 2011. Soil salinity and sodicity as particular plant/crop stress factors. En: Hand book of plant and crop stress. Pessaraki M. (ed.) CRC Press, Boca Raton, Florida USA, pp. 3-22.
- Piñeiro M. y López Saubidet R. 2008. Tendencias y escenarios de la innovación en el sector agroalimentario. Secretaría de Ciencia y Técnica pp. 232-244.
- Polhill R.M. 1976. Genisteeae (Adanson) Bentham and Related Tribes (Leguminosae). *Bot. Syst.* 1: 143-368. Royal. Bot. Garden. Kew.
- Pratap V. and Sharma Y.K. 2010. Impact of osmotic stress on seed germination and seedling growth in black gram (*Phaseolus mungo*). *Journal of Environmental Biology* 31(5) 721-726.
- Procházková D. and Wilhemová N. 2011. Antioxidant protection during abiotic stresses. En: En: Hand book of plant and crop stress. Pessaraki M. CRC Press, Boca Raton, Florida USA. 139-190 pp.
- Ramos J.C., Perreta M.G., Tivanoy J.C., Vegetti A.C. 2004. Variaciones anatómicas en la raíz de *Pappophorum philippianum* inducidas por salinidad. *Phyton* 103-109.
- Ramos Font M.E. 2009. Sistemas Agrosilvopastoriles en el Sudeste Ibérico: una alternativa sostenible a los monocultivos leñosos de Secano. Tesis Doctoral, Universidad de Granada. Facultad de Ciencias departamento Ecología. Publicado en Internet, disponible <http://hera.ugr.es/tesisugr/18325191.pdf>. 336 pp. Activo noviembre 2010.
- Rangaswamy N.S. and Nandakumarn L. 1985. Correlative studies on seed coat structure, chemical composition, and impermeability in the legume *Rhynchosia minima*. *The Botanical Gazette* 146:501-509.
- Reginato M. 2009. Respuesta de la halófito *Prosopis strombulifera* a diferentes medios salinos. Modificaciones de los parámetros morfofisiológicos y su regulación hormonal. Tesis Doctoral. Universidad Nacional de Río Cuarto, Córdoba, Argentina, 149 pp.

- Reigosa M.J. y Pedrol N. 2004. El estrés y la medida del estrés en las plantas. En: La ecofisiología vegetal. Una ciencia de síntesis. Thomson Editores Spain. 1-57 pp.
- Reinhardt D.H, and Rost T.L. 1995a. Salinity accelerates endodermal development and induces an exodermis in cotton seedlings roots. *Environmental and experimental Botany* 35: 563-574.
- Reinhardt D.H. and Rost T.L. 1995b. Developmental-changes of cotton root primary tissues induced by salinity. *1995 International Journal of Plant Science* 156 (4): 505-513.
- Renzi J.P. 2008. Producción de semillas de cultivares y poblaciones de *Vicia* spp. XXI Congreso Panamericano de Semillas. Cartagena, Colombia, 14-17-10-2008.
- Renzi J.P, Chantre GR. and Cantamutto M.A. 2014. Development of a thermal-time model for combinational dormancy release of hairy vetch (*Vicia villosa* ssp. *villosa*). *Crop & Pasture Science* 65, 470–478.
- Reveneau M.P., Coste F., Moreau-Valancogne P., Lejeune-Hénaut I. and Durr C. 2011. Pea and Bean germination and seedling responses to temperature and water potential. *Seed Science Research* 21(3):205-213.
- Rewald B., Shelef O., Ephrath J.E., Rachmilevitch S. 2013. Adaptive plasticity of salt-stressed root system. Chapter 6. En: *Ecophysiology and responses of plants under salt stress*. Ahmas P., Azooz M.M. & Prasad M.N.V. Springer, New York. USA. 169-202 pp.
- Richards R.A., Rebetzke G.J., Condon A.G. and Herwaarden A.F. 2002. Breeding opportunities for increasing the efficiency of water use and crop yield in temperate cereals. *Crop Science* 42: 111-121.
- Risso D.F. y Berretta E.J. 2001. Tecnologías forrajeras para sistemas ganaderos de Uruguay. INIA. Hemisferio Sur. Tacuarembó, Montevideo-Uruguay.. (INIA Boletín de Divulgación 76) 182pp.
- Rodriguez A.R. y de la Casa A.C. 1990. Regiones hídricas de la República Argentina. *Rev.Cs. Agrop.* VII:31-40.
- Rugină R., Toma C. and Ivănescu L. 2006. Morphological and histo-anatomical aspects at some Dicotyledonate seedlings related to the vascular transition. *Analele științifice ale Universității “Al. I. Cuza” Iași Tomul LII, s. II a. Biologie vegetală.* 123-131.
- Ruiz M.A. 2009. Comportamiento ecofisiológico del Tricepiro (X *Triticosecale* Wittmack x *Agroticum* Ciferri & Giacom) en relación a Triticale (X *Triticosecale* Wittmack) y Trigopiro (x *Agroticum* Ciferri & Giacom). Tesis Doctoral. Universidad Nacional de Córdoba, Córdoba, Argentina. 233 pp.
- Sağlam S., Day S., Kaya G., Gürbüz A. Hydropriming increases germination of lentil (*Lens culinaris* Medik.) under water stress. 2010. *Not Sci Biol* 2 (2): 103-106.
- Saibo N.J.M., Lourenço T. and Oliveira M.M. 2009. Transcription factors and regulation of photosynthetic and related metabolism under environmental stresses. *Annals of Botany* 103: 609–623.
- Saint-Martin M. 1986. Micromorphologie tegumentaire des grains de Papilionaceae. *Bull. Soc. Bot. Fr.* 133 (2): 137-153.

- Saleem M., Lamkemeyer T., Schützenmeister, Madlung J., Sakai H., Piepho H.P., Nordheim A., Hochholdinger F. 2010. Specification of cortical parenchyma and stele of maize primary roots by asymmetric levels of auxin, cytokinin, and cytokinin-regulated proteins. *Plant Physiol* 152: 4-18.
- Sanderson M.J. and Wojciechowski M.F. 1995. Molecular phylogenetic analysis of a temperate legume clade (Fabaceae). *American Journal of Botany* (supplement) 82 (6): 159.
- Shannon M.C. and Grieve C.M. 1999. Tolerance of vegetable crops to salinity. *Scientia Horticulturae* 78: 5-38.
- Sharma M. L. 1973. Simulation of drought and its effect on germination of five pasture species. *Agron. J.* 65: 982-987.
- Sharma P., Jha A.B, Dubey R.S. 2011. Oxidative Stress and antioxidative defence systems in plants growing under abiotic stresses. Capítulo 5. En: *Hand book of plant and crop stress*. Pessarakli M. CRC Press, Boca Raton, Florida USA. 89-138 pp.
- Skerman P.J., Cameron D.G. y Riveros F. 1991. Leguminosas forrajeras tropicales. Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación. Colección FAO: Producción y Protección vegetal. Roma. 708 pp.
- Sosa L., Llanes A., Reinoso H., Reginato M. and Luna V. 2005. Osmotic and specific ion effects on the germination of *Prosopis strombulifera*. *Annals of Botany* 96: 261-267.
- Taiz L. and Zeiger E. 2010. Stress physiology. En: *Plant Physiology*. Sinauer Ass. Inc. Pub. Sunderland, (Mass.) USA. pp. 591-623.
- Tourn G.M. 2004. Formas de crecimiento en especies argentinas del Género *Galactia*, Sección *Odonia* (Fabaceae), provenientes de áreas ecológicas diferentes. Tesis Doctoral. Universidad Nacional de Córdoba, Córdoba, Argentina. 59 pp.
- Tourn G.M., Cosa M.T., Roitman O.G. y Silva M.P. 2009. Comparative leaf anatomy in Argentine *Galactia* species. *Bol. Soc. Bot.* (1-2):25-32.
- Tourn G.M., Roitman G., Fortunato R. y Zarlavsky G. 1996. El complejo axilar en leguminosas argentinas: ¿un carácter de importancia filogenética? Libro de Resúmenes de las XXV Jornadas Argentinas de Botánica. 18-22 de noviembre. Mendoza. p. 36.
- Tropical Forages. 2009. *Vicia villosa* subsp. varia. Disponible en: http://www.tropicalforages.info/key/Forages/Media/Html/Vicia_villosa_subsp_varia.htm. Activo octubre 2009.
- Tully R.E., Musgrave M.E. and Leopold A.C. 1981. The seed coat as a control of imbibitional chilling injury. *Crop Sci.* 21: 312-317.
- Turner N.C. 1986. Adaptation to water deficits: a changing perspective. *Australian Journal of Plant Physiology* 13:175-190.
- Uchiyama Y. 1987. Salt tolerance of *Atriplex nummularia*. *Technical Bulletin of the Tropical Agricultural Research Center* 22: 1-69.
- Ungar I. 1996. Effect of salinity on seed germination, growth and ion accumulation of *Atriplex patula* (Chenopodiaceae). *American Journal of Botany* 83: 604-607.

- Valladares F., Vilagrosa A., Peñuelas J., Ogaya R., Camarero J.J., Corcuera L., Sisó S. y Gil-Peigrín E. 2004. Estrés hídrico: Ecofisiología y escalas de la sequía. Capítulo 6. En: Ecología del bosque mediterráneo en un mundo cambiante. Ministerio del Medio Ambiente, EGRAF, SA. Madrid. 163-190 pp.
- Van Dongen J.T., Ammerlaan A.M.H., Wouterlood M., Van Aelst A.C. and Borstlap A.C. 2003. Structure of the developing pea seed coat and the post-phloem transport pathway of nutrients. *Annals of Botany* 91:729-737.
- Verslues P.E., Agarwal M., Katiyar-Agarwal S., Zhu J. and Zhu J.K. 2006. Methods and concepts in quantifying resistance to drought, salt and freezing, abiotic stresses that affect plant water status. *The Plant Journal* 45:523-539.
- Wang J. 2013. Seed germination of four *Vicia* species grown in alpine grassland responses to temperature and water. Agricultural Science paper, abstract. <http://www.agrpaper.com/seed-germination-of-four-vicia-species-grown-in-alpine-grassland-responses-to-temperature-and-water.htm>. Activo marzo 2013.
- Werker E. 1997. Seed Anatomy. Gebrüder Borntraeger, Berlin, Stuttgart. 424 pp.
- Yaklich R.W., Vigil E.L. and Wergin W.P. 1989. The pit and antipit in the genus *Glycine*. *Crop. Sci.* 29: 1304-1309.
- Yaklich R.W., Wergin, W.P. and Erbe E.F. 1996. Observation of unique structures between the endosperm and embryo seeds of *Glycine max*. *Seed Science Research* 6: 183-189.
- Ye N. 1983. Studies on the seedling types of dicotyledonous plants (Magnoliophyta, Magnoliopsida). *Phytologia* vol. 54, 3, 161-189.
- Zarlavsky G., Angyalossy-Alfonso V., Bartoli A., Basilio A., Bernardello G., Borrelli L., Castro M.A., Cortadi A.A., De Magistris A.A., Galati B., Gurni A.A., Las Peñas M.L., Mantese A.I., Pelliza de Sbriller A., Rodríguez M.F., Rosenfeldt S., Stiefkens L., Tortosa R. y Zarlavsky G.E. 2014. Histología Vegetal técnicas simples y complejas. 1° ed. Bs. As., Sociedad Argentina de Botánica. 198 pp.
- Zhao K.F. and Harris P.J.C. 1992. The effects of iso-osmotic salt and water stresses on the growth of halophytes and non halophytes. *Journal of Plant Physiology* 139:761-763.
- Zhao K., Hai F., San Z. and Jie S. 2003. Study on the salt and drought tolerance of *Suaeda salsa* and *Kalanchoe clavigremontiana* under of iso-osmotic salt and water stress. *Plant Science* 165:837-844.
- Zidan I., Azaizah H., Neumann P.M. 1990. Does salinity reduce growth in maize root epidermal cells inhibiting their capacity for cell wall acidification? *Plant Physiology* 93: 7-11. (citado por Ceccoli).