

**UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA
FACULTAD DE AGRONOMÍA**

**VARIABILIDAD EN EL COMPORTAMIENTO GERMINATIVO
Y EN LA DORMICIÓN POR CUBIERTAS ENTRE DIFERENTES
GENOTIPOS DE *Paspalum dilatatum* POIR.**

por

Nicolás Alberto GLISON LARTIGAU

TESIS presentada como uno de los
requisitos para obtener el título de
Magister en Ciencias Agrarias,
opción Ciencias Vegetales.

MONTEVIDEO
URUGUAY
mayo, 2013

PÁGINA DE APROBACIÓN

Tesis aprobada por el tribunal integrado por el Ing. Agr. PhD. Roberto Benech-Arnold, la Ing. Agr. MSc. Patricia Cornaglia, el Ing. Agr. PhD. Valentín Picasso y la Ing. Agr. MSc. Cecilia Jones, el 31 de mayo de 2013. Autor: Lic. (Bq.) Nicolás Glison. Director: Ing. Agr. (PhD.) Pablo Speranza, Co-director: Ing. Agr. (MSc.) Luis Viega.

AGRADECIMIENTOS Y DEDICATORIA

A familiares y amigos, en particular mi madre, Stella Lartigau, mi hermano, Federico Glison, y mis tíos, Graciela Glison y José Alem, que siempre me apoyaron en la locura de hacer ciencia en el país. También, agradecer a la familia Lacreu–Lipszyc de Buenos Aires por el apoyo brindado, en especial a “Toto” Dojtman.

A mis tutores: Luis Viega, por brindarme diversas oportunidades y el trabajo que disfruto, y Pablo Speranza, por mostrarme de qué se trata esto de hacer ciencia.

A Patricia Cornaglia y a Fabiana Pezzani, que estuvieron a disposición para lo que fuera necesario.

A Lucía Gutiérrez, Alejandra Borges y Pablo González que me asesoraron con el diseño experimental y el análisis de datos.

A mis compañeros docentes de Fisiología Vegetal y al grupo de “paspaleros” por todo el apoyo, y a los funcionarios Julio Sburlatti y Yolanda Fernández que colaboraron con actividades de la Tesis.

A los Lic. Mauricio Tejera y Alfredo López a los bachilleres Soledad Rodríguez, Nicolás Mastandrea, Gregorio Moreira, Pablo Posada e Isabel Aime, entre otros, quienes colaboraron con una mano desinteresada en el cuidado de plantas, cosecha de semillas, armado de germinadores y otras tareas.

A la empresa Estero S. A. por permitirnos utilizar sus instalaciones y equipos.

Este trabajo fue financiado por fondos del proyecto FPTA 177 del INIA (Responsable: Pablo Speranza) y por una Beca de Posgrados otorgada por la ANII (2011-2012).

Dedico este trabajo a mi esposa, Maura Lacreu, quien me acompañó durante todo el largo proceso de la Tesis con su aliento y amor.

TABLA DE CONTENIDO

	Página
PÁGINA DE APROBACIÓN	II
AGRADECIMIENTOS Y DEDICATORIA	III
RESUMEN.....	VI
SUMMARY	VII
<u>I. INTRODUCCIÓN</u>	1
I.A. <i>PASPALUM DILATATUM</i> COMO PASTURA ESTIVAL: VENTAJAS Y DIFICULTADES	1
<u>I.A.1. Características de <i>P. dilatatum</i></u>	1
<u>I.A.2. Limitantes a nivel de semillas para su adopción</u>	3
<u>I.A.3. Variabilidad genética natural en la región</u>	4
I.B. DORMICIÓN DE SEMILLAS.....	6
<u>I.B.1. Definición de dormición de semillas</u>	6
<u>I.B.2. Mecanismos de la dormición: embrional o impuesta por cubiertas</u>	7
<u>I.B.3. Rol del ácido abscísico y las giberelinas sobre la dormición y la germinación</u>	9
<u>I.B.4. Características ecofisiológicas de la dormición</u>	11
I.B.4.a. Factores que afectan el nivel de dormición	12
I.B.4.b. Factores que terminan la dormición o inducen la germinación ..	14
I.C. OBJETIVOS	16
<u>I.C.1. Objetivo general</u>	16
<u>I.C.2. Objetivos específicos</u>	16
<u>II. LA VARIABILIDAD EN EL COMPORTAMIENTO GERMINATIVO DE SEMILLAS DE <i>PASPALUM DILATATUM</i> POIR. ES DEPENDIENTE DEL GENOTIPO</u>	17
II.A. RESUMEN	17
II.B. SUMMARY.....	18
II.C. INTRODUCCIÓN	19

II.D. MATERIALES Y MÉTODOS.....	21
<u>II.D.1. Material vegetal, cosecha de semillas y condiciones de almacenamiento</u>	21
<u>II.D.2. Ensayos de germinación y tratamientos de pre-imbibición</u>	22
<u>II.D.3. Análisis estadístico</u>	23
II.E. RESULTADOS.....	24
II.F. DISCUSIÓN	31
II.G. CONCLUSIONES.....	34
II.H. BIBLIOGRAFÍA	35
<u>III. DIFERENCIAS EN LA INCIDENCIA DE LA LEMA SOBRE LA DORMICIÓN DE SEMILLAS ENTRE GENOTIPOS DE <i>PASPALUM DILATATUM</i> POIR.</u>	40
III.A. RESUMEN.....	40
III.B. SUMMARY	41
III.C. INTRODUCCIÓN.....	42
III.D. MATERIALES Y MÉTODOS	44
<u>III.D.1. Material vegetal y cosecha de semillas</u>	44
<u>III.D.2. Ensayos de germinación con semillas escarificadas y sin lema</u>	44
<u>III.D.3. Ensayos de imbibición con semillas escarificadas y sin lema</u>	45
<u>III.D.4. Ensayos de sensibilidad al ABA exógeno</u>	46
<u>III.D.5. Características físicas de las lemas</u>	47
III.E. RESULTADOS	47
<u>III.E.1. Ensayos de germinación</u>	47
<u>III.E.2. Ensayos de imbibición</u>	49
<u>III.E.3. Ensayos de sensibilidad al ABA exógeno</u>	49
<u>III.E.4. Características físicas de las lemas</u>	52
III.F. DISCUSIÓN	52
III.G. CONCLUSIONES	55
III.H. BIBLIOGRAFÍA.....	56
<u>IV. CONCLUSIONES GENERALES Y PERSPECTIVA A FUTURO</u>	61
<u>V. BIBLIOGRAFÍA</u>	63

RESUMEN

El estudio de la variabilidad en el comportamiento germinativo puede contribuir significativamente al proceso de domesticación de una especie. *Paspalum dilatatum* es una gramínea estival de interés forrajero, pero sus semillas presentan baja germinación lo cual limita su adopción. En esta especie se han sugerido diferencias entre biotipos en la dormición de semillas, y las cubiertas serían las principales limitantes a la germinación. El almacenamiento en seco y tratamientos de pre-imbibición disminuyen la dormición de las semillas. En el presente trabajo se estudió la variabilidad en el comportamiento germinativo entre 16 genotipos de *P. dilatatum*, que representan la variabilidad genética natural, analizando la respuesta a tres tiempos de almacenamiento (0, 3 y 6 meses) y tres tratamientos de pre-imbibición (a 5, 20 °C, y sin pre-imbibición). A su vez, semillas de genotipos con comportamientos contrastantes fueron sometidas a la extracción manual de la lema para estudiar la respuesta germinativa, la imbibición y la sensibilidad al ácido abscísico (ABA), considerando dos tiempos de almacenamiento (1 y 5 meses). Se registró variabilidad en la respuesta del comportamiento germinativo a los tratamientos de pre-imbibición y al tiempo de almacenamiento aunque en general ambos promovieron la germinación. En particular los biotipos Virasoro y Chirú presentaron un comportamiento germinativo diferente al resto de los genotipos. Por otra parte, la extracción manual de la lema incrementó la germinación en todos los genotipos, excepto en el biotipo Chirú que registro muy alta germinación en todos los tratamientos. A su vez, un mayor tiempo de almacenamiento incrementó la germinación y resultó en menor sensibilidad al ABA, tanto en semillas sin lema como enteras, sugiriendo que el almacenamiento tendría un efecto sobre el cariopse. Se concluye que la dormición de cada genotipo no se explicaría sólo por las características de las cubiertas sino que estarían involucrados procesos fisiológicos dentro del cariopse, y que la existencia de variabilidad en la germinación permite seleccionar genotipos más apropiados para su adopción como cultivo.

Palabras clave: biotipos de *P. dilatatum*, variabilidad intra-específica, pre-*chilling*, posmaduración, dormición por cubiertas.

VARIABILITY IN GERMINATION BEHAVIOUR AND IN COAT-IMPOSED DORMANCY AMONG DIFFERENT *Paspalum dilatatum* POIR. GENOTYPES

SUMMARY

The study of variability for germinative behaviour can make a significant contribution to the domestication process of a species. *Paspalum dilatatum* Poir. is a warm-season grass with potential as a forage crop, but low seed germination hinders its adoption. In this species, differences in seed dormancy among biotypes have been suggested and the seed coats are thought to be the major constraint to germination. Dry storage and pre-imbibition treatments have been shown to release seed dormancy. In the present work, variability in seed germination behaviour was studied in 16 *P. dilatatum* genotypes, representing the known natural genetic variability for the species, by analyzing the response to three seed storage times (0, 3 and 6 months) and three pre-imbibition treatments (at 5 and 20 °C, and without pre-imbibition). In turn, seeds of some genotypes were subjected to manual removal of the lemma to study the germination, imbibition and sensitivity to abscisic acid (ABA), considering two storage times (1 and 5 months). Variability in germination behaviour and responses to dry storage times was observed among genotypes, although in general both promoted germination. Particularly the Virasoro and Chirú biotypes showed different germination behaviour from other genotypes. Moreover, the removal of the lemma increased germination in all genotypes, except Chirú which showed a high germination in all treatments. In turn, longer storage times increased germination, and resulted in reduced sensitivity to ABA, in untreated seeds and after the removal of the lemma similarly, suggesting that storage time may have an effect on the caryopsis itself. We concluded that seed dormancy of each genotype may not be explained by the coat characteristics only, and that the existence of variability in seed germination makes it possible to select genotypes suitable for adoption as a crop.

Keywords: *P. dilatatum* biotypes, intra-specific variability, pre-chilling, after-ripening, coat-imposed dormancy

I. INTRODUCCIÓN

La domesticación es el resultado de un proceso de selección que permite la adaptación de las plantas a un ambiente manejado por el hombre. Las especies domesticadas presentan semillas con mayor tamaño que las silvestres, además de que retienen las semillas sobre la planta madre (Gepts, 2004, Fuller y Allaby, 2009). Otra característica de las semillas de especies domesticadas es que presentan baja o nula dormición, mientras que es mayor en las especies silvestres (Gepts, 2004). La dormición es un carácter heredable complejo, que ha sido muy estudiado en unas pocas especies, pero no hay mucha información en especies silvestres (Bewley, 1997). En estas especies, se ha reportado variabilidad inter- e intra- poblacional en su dormición, que se refleja en comportamientos germinativos divergentes (Baskin y Baskin, 2000). Las especies de gramíneas estivales con valor forrajero como *Paspalum dilatatum* Poir. se consideran poco domesticadas, y sus semillas presentan características de dormición similares a sus formas silvestres (Adkins et al., 2002). Para iniciar el proceso de domesticación, resulta importante el estudio de la dormición que presenta la especie de interés, la variabilidad natural del carácter y el mecanismo fisiológico que subyace. Para ello, se requiere conocer la variabilidad genética natural de la especie, y evaluar si existen diferencias entre genotipos en el comportamiento germinativo de las semillas. En definitiva, seleccionar un biotipo, ecotipo, o forma que presente menor dormición podría ser un objetivo inicial del proceso de domesticación.

I.A. PASPALUM DILATATUM COMO PASTURA ESTIVAL: VENTAJAS Y DIFICULTADES

I.A.1. Características de *P. dilatatum*

Paspalum dilatatum Poir. pertenece a la familia de las gramíneas (Poaceae), subfamilia Panicoideae, tribu de las paníceas (Paniceae). Su sitio de origen se encuentra al sureste de América del Sur, región que comprende el Uruguay, el litoral y centro de Argentina y el sur de Brasil. Sus hojas presentan anatomía “Kranz” y por tanto un metabolismo fotosintético de tipo C₄, confiriéndole alta eficiencia de uso del agua y

máxima actividad fotosintética en altas temperaturas (Blaikie et al., 1988). Esto explica que su crecimiento óptimo se encuentre alrededor de los 30 °C (Mitchell y Lucanus, 1962).

Sin embargo, *P. dilatatum* suele encontrarse en sitios de climas templados, debido a su tolerancia a diversos eventos de estrés abiótico frecuentes en la región, como heladas e inundaciones que son comunes en los inviernos, y déficit hídricos usuales en los veranos (Loreti y Oosterheld, 1996, Campbell et al., 1999). Características como la baja sensibilidad al congelamiento de los tejidos foliares y un perfil climático diferente a otras pasturas de metabolismo C₄ la distinguen de otras gramíneas estivales (Rowley et al., 1975, Campbell et al., 1999). Estas características le permitieron colonizar otros sitios con ambientes similares al de la región, como la Isla Norte de Nueva Zelanda, el Estado de Victoria en Australia y el sureste de Estados Unidos (Percival, 1977, Lawson et al., 2003, Thom, 2003, Venuto et al., 2003).

Por sus características de crecimiento y su tolerancia al clima de la región, *P. dilatatum* ha sido propuesta como gramínea estival a incorporar en las pasturas sembradas (Carámbula, 2002). Actualmente, la producción de forraje en la región muestra una variación estacional, presentando un déficit en el verano porque las especies sembradas, las cuales son de crecimiento invernal, entran en reposo con tasas de crecimiento nulas (Santiñaque, 1979, Coll, 1991). Esto resulta en una explotación ineficiente del ambiente en verano y un enmalezamiento precoz por especies estivales, como la gramilla [*Cynodon dactylon* (L.) Pers.] (Ríos et al., 1990, García, 1995). *P. dilatatum* presenta adaptabilidad a la región, valor forrajero y un ciclo de crecimiento complementario a las especies invernales sembradas (Johnston, 1996, Cornaglia, 2003, Venuto et al., 2003). Por tanto, incorporarlo a las mezclas sembradas contribuiría a disminuir la fluctuación de forraje y a incrementar la persistencia de las praderas (Santiñaque, 1979, García, 1995). Las mezclas con *P. dilatatum*, raigrás perenne (*Lolium perenne* L.) y trebol blanco (*Trifolium repens* L.) fueron populares en Nueva Zelanda y Australia, presentando mayor potencial de

producción de biomasa total y de leche que mezclas sin *P. dilatatum* (Lawson et al., 2003, Thom, 2003).

I.A.2. Limitantes a nivel de semillas para su adopción

Al igual que otras gramíneas estivales apomícticas, presentan diversas dificultades para la cosecha de semillas viables. En primer lugar, como otras especies estivales, presenta una importante amplitud de período de floración, que va desde el final de la primavera hasta mediados del otoño (Campbell, 1999, Pizarro, 2000). La emisión de panojas es fluctuante, presentando al principio del verano y al principio del otoño los momentos de mayor producción de panojas, dado que la temperatura óptima de aparición de inflorescencias es de 20 °C (García, 1971, Pearson y Shah, 1981). Otra dificultad radica en que las semillas sufren abscisión entre 15 a 18 días después de la antesis, por lo cual no son retenidas en las panojas (Burson et al., 1978). En resultados recientes, se reportó que el momento de mayor caída de semillas se alcanza entre 300 y 400 grados-día posteriores a la emergencia de la panoja (Cuña et al., 2012). A su vez, la proporción de semillas viables es generalmente bajo y varía según la temperatura, la humedad relativa mínima y la disponibilidad hídrica del suelo (Bennett, 1959, Pearson y Shah, 1981, Coll, 1991). Una dificultad extra es la infección de espiguillas provocada por el hongo *Claviceps paspali* Stevens & Hall, que produce una miel que dificulta la cosecha de semillas (Luttrell, 1977). La incidencia de *C. paspali* también varía por factores climáticos, siendo mayor cuando se presentan veranos más húmedos (García, 1971, Schrauf et al., 2003).

Por otro lado, las semillas viables presentan dificultades para la germinación y emergencia a campo, atribuidas a que tienen dormición. En las reglas de la “International Seed Testing Association” (ISTA, 1999), se recomiendan temperaturas alternantes (20 / 35 °C, 16 / 8 h), con ciclo de oscuridad / luz, colocando las semillas sobre papel absorbente con una solución de nitrato al 0,2 % (m/v), durante 28 días, requerimientos similares a los sugeridos para otras paníceas (Loch y Ferguson, 1999). Unos de los tratamientos más practicados para obtener mayor germinación en especies de *Paspalum* ha sido la escarificación ácida o mecánica, debido a que las

cubiertas (lema y pálea del antecio fértil) son importantes en la limitación de la germinación (Fulbright y Flenniken, 1988, West y Marousky, 1989, Coll, 1991). Las cubiertas de paníceas presentan una sección abatible en la lema, conocido como “tapa de germinación”, reflejando la importancia de estas estructuras (Rost, 1975, Thomasson, 1978, Loch et al., 2004). La germinación no sólo es promovida por la alteración de las cubiertas: una alta disponibilidad de agua (Cornaglia et al. 2005) o condiciones de campo como una inundación y la ausencia de vegetación resultan en una mayor emergencia de plantines de *P. dilatatum* (Cornaglia et al., 2009). Estas condiciones de campo se corresponden con los requerimientos para la germinación ya mencionados. Además, los plantines logran sobrevivir si las condiciones hídricas son buenas durante los primeros meses de establecimiento y hasta el momento en que logran desarrollar sus rizomas (Thom, 2003, Cornaglia et al., 2005). Como consecuencia, esta especie suele emerger en el campo durante la primavera en lugares con buena disponibilidad de agua y en vacíos en el tapiz vegetal (Cornaglia, 2003).

I.A.3. Variabilidad genética natural en la región

La mayor parte de los trabajos sobre la especie fueron realizados sobre el biotipo común, el cual es pentaploide con fórmula genómica $2n = 2x = 50$ (IIJX) y se reproduce por apomixis, por tanto, las semillas son genéticamente idénticas a la planta madre (Bashaw y Forbes, 1958, Bashaw y Holt, 1958, Burson, 1991). Es común que la apomixis esté asociada a características como la poliploidía y la hibridación interespecífica, resultando inadecuada la definición clásica de especie (Asker y Jerling, 1992). *P. dilatatum*, junto a otras especies relacionadas, forma parte del grupo taxonómico informal dentro del género, conocido como grupo Dilatata (*Paspalum*, Poaceae), incluyendo biotipos sexuales tetraploides que presentan la fórmula genómica IIJJ: *P. urvillei* Steud., *P. dasypleurum* Kunze ex Desv., *P. dilatatum* ssp. *flavescens* Roseng. Arr. & Izag. y los biotipos Virasoro y Vacaria (Burson et al., 1973, Speranza, 2005a). También, forman parte del grupo Dilatata biotipos hexa- y heptaploides apomícticos, entre los cuales está el biotipo Chirú (referido como “Uruguayan”), cuya fórmula genómica es $2n = 6x = 60$ (IIJXX)

(Burson, 1991). Estos biotipos distintos al común se encuentran únicamente en la región de origen de la especie.

Diversos autores han sugerido que el biotipo común se comporta como apomítico obligado (Bashaw y Holt, 1958, Burson, 1991, Schrauf, 2003). Sin embargo, Machado et al. (2005) reportaron la existencia en la región de biotipos pentaploides fenotípicamente diferentes al común. Mediante marcadores moleculares codominantes (microsatélites) diseñados para la especie, se demostró que estos pentaploides “fuera de tipo” eran clones menores, fruto de la recombinación entre alguno de los biotipos sexuales con el biotipo común (Speranza, 2005a). Estos clones recombinantes se encuentran sólo en regiones donde coexisten (o coexistieron) algún biotipo sexual y el común, mientras que accesiones de *P. dilatatum* pentaploide del resto del mundo resultaron iguales o variantes mutacionales del biotipo común (Speranza, 2005b). Esta información implica que es probable encontrar en la región biotipos pentaploides fuera de tipo de origen natural.

Resulta de interés conocer si la variabilidad genética natural se traduce en variabilidad fenotípica en características de interés. Se han registrado diferencias en características morfofisiológicas entre biotipos y entre clones (Venuto et al., 2003, Alonso y Monterubbianesi, 2006). Como ejemplo, el biotipo Chirú ha presentado ventajas productivas sobre el biotipo común y ha sido señalada como una candidata a ser utilizada como cultivar a nivel nacional (Coll, 1991, Venuto et al., 2003). Incluso, se han registrado diferencias entre biotipos en la producción de semillas y la respuesta germinativa de las mismas, limitantes principales para su adopción productiva (Souza-Chies y Cavalli-Molina, 1995, Tischler y Burson, 1999). Mientras tanto, son más recientes los trabajos de caracterización fenotípica entre clones recombinantes con respecto al común. Actualmente, en dos Tesis de Ingeniero Agrónomo de la Facultad de Agronomía, UdelaR., se han reportado diferencias morfofisiológicas entre grupos genéticos (asociados al biotipo sexual que resultó progenitor del clon), e incluso entre clones de un mismo grupo genético, aunque en menor grado (Michelini, 2010, Rodríguez, 2010). Los genotipos escogidos para la

presente Tesis surgen de una selección de los materiales evaluados por Michelini (2010) y Rodríguez (2010).

I.B. DORMICIÓN DE SEMILLAS

Para un estudio adecuado de la dormición de cualquier especie, se requiere entender este complejo proceso. Esta sección tiene como objetivo precisar el actual marco teórico de la dormición para entender en términos fisiológicos el comportamiento germinativo que muestran las semillas, incluso las de *P. dilatatum*. No se busca profundizar en las intrincadas respuestas hormonales ni en los genes involucrados, reportados en revisiones recientes (Kucera et al., 2005, Finkelstein et al., 2008, Holdsworth et al., 2008). Por otra parte, la discusión se restringe a la dormición fisiológica, según la clasificación sugerida por Baskin y Baskin (2004), la cual es el tipo de dormición más distribuida. Esto excluye la dormición provocada por cubiertas muy duras e impermeables (dormición física), y la dormición por inmadurez del embrión (dormición morfológica).

I.B.1. Definición de dormición de semillas

A pesar de haber sido un proceso estudiado durante mucho tiempo, la definición de la dormición de semillas ha resultado un tópico de intensa discusión (ver reseña en Vleeshouwers et al., 1995). Esto se ha debido a que el proceso no era claramente entendido, combinado con problemas en el diseño e implementación de experimentos causados por suposiciones inapropiadas (Vleeshouwers et al., 1995, Cohn, 1996). Pero principalmente, a que la forma de determinar la dormición radica en medir la ausencia de germinación (Hilhorst, 1995). Actualmente, la definición con mayor consenso es que la dormición es un impedimento interno de las semillas para la germinación en condiciones de temperatura, humedad y oxígeno, que serían adecuadas (Benech-Arnold et al., 2000). Esta definición apunta a separar las limitantes internas de la germinación de las limitantes impuestas por factores externos. Se entiende que las semillas en dormición se encuentran activas porque pueden responder al ambiente (Vleeshouwers et al., 1995). Por tanto, no

corresponden los términos latencia o quiescencia, que han sido usados como sinónimo de dormición (Foley, 2001).

Otro aspecto de consenso es la distinción entre la dormición y la germinación. Una semilla puede germinar o no (respuesta de “todo o nada”), pero su dormición puede tener cualquier nivel dentro de un rango dado que va de una dormición máxima a una dormición mínima (Finch-Savage y Leubner-Metzger, 2006). El concepto de niveles de dormición fue introducido por Vegis (1964), según la germinación de las semillas ante un rango de temperaturas dado: si las semillas logran germinar en un rango amplio de temperaturas, el nivel de dormición será bajo, y viceversa. En el mismo sentido, la germinación en un rango amplio de potenciales hídricos o una alta sensibilidad a factores que promueven la germinación (ver I.B.4.b.) se han asociado a niveles de dormición bajos (Baskin y Baskin, 2000, Bradford, 2002). Entonces, el nivel de dormición define qué condiciones ambientales se deben cumplir para que la semilla germine. Esto significa que la germinación en el campo estaría restringida al período donde se solapan la temperatura del suelo y el rango de temperaturas que permiten la germinación, en interacción con la humedad del suelo requerida (Vleeshouwers et al., 1995, Benech-Arnold et al., 2000). Los diferentes niveles de dormición juntos forman una escala continua que va entre la máxima dormición (que podría ser no germinar bajo ninguna temperatura) y el mínimo nivel posible. Los cambios del nivel de dormición no suceden de forma abrupta, ya que están gobernados por factores ambientales, como la temperatura y la humedad del suelo (ver I.B.4.a.), asociados a cambios estacionales anuales (Baskin y Baskin, 2000, Benech-Arnold et al., 2000). Aunque no hay una forma directa de cuantificar el nivel de dormición, se pueden demostrar cambios al germinar las semillas de interés ante diferentes temperaturas, potenciales hídricos o niveles de factores que promueven la germinación (Foley, 2001).

I.B.2. Mecanismos de la dormición: embrional o impuesta por cubiertas

La germinación sucede cuando el embrión crece. Las limitantes que la evitan pueden originarse en el propio embrión o en las estructuras que lo rodean, llamadas

genéricamente cubiertas. Para identificar donde se origina la dormición, se suelen realizar ensayos de germinación con semillas íntegras y con embriones aislados. Si las semillas no germinan pero los embriones aislados logran la germinación, la dormición se debe a las cubiertas, pero si los embriones aislados tampoco germinan, la dormición es embrional (Bewley y Black, 1994).

La dormición impuesta por cubiertas es de mayor prevalencia que la embrional (Foley, 2001), y se ha subdividido según el tipo de impedimento que ejercen las cubiertas. Puede deberse a la presencia de inhibidores de la germinación en las cubiertas, como el ácido abscísico (ABA). Este mecanismo se ha deducido porque la germinación de embriones aislados es inhibida por estar en contacto con las cubiertas (Bewley y Black, 1994, Adkins et al., 2002). Otro mecanismo de dormición, propuesto tanto en cebada como especies silvestres, se debe a que las cubiertas interfieren sobre el intercambio gaseoso, secuestrando el O₂ (Dungey y Pinfield, 1980, Whiteman y Mendra, 1982). Sin embargo, la dormición no está asociada a una menor respiración, sino que el O₂ es necesario para degradar el ABA (Bewley y Black, 1994). En las glumelas de cebada, ocurre el secuestro del O₂ provocado por la actividad polifenol oxidasa (Lenoir et al., 1986). Por último, las cubiertas pueden imponer una resistencia mecánica mayor al potencial de crecimiento del embrión (Schopfer y Plachy, 1985), la cual puede resultar alta (133 MPa en *Iris loireteti* Barb.) o muy baja (10 MPa en *Panicum maritimum* L.) según la especie (Blumenthal et al., 1986). Se ha reportado como el mecanismo de dormición predominante en especies como *Arabidopsis thaliana* L.) y tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.), las cuales requieren el ablandamiento del endosperma micropilar para la germinación (Ni y Bradford, 1993, Finch-Savage y Leubner-Metzger, 2006). La resistencia mecánica, también, ha sido postulada como el mecanismo predominante en semillas de paníceas, debido a la presencia de lema y pálea endurecidas (Fulbright y Flenniken, 1988).

Por otro lado, la dormición embrional se ha reportado en especies leñosas, como en semillas de la familia Rosaceae y algunas gramíneas como *Avena fatua* L. (Kermode, 2005), y se explica por la presencia de inhibidores de la germinación en el embrión,

principalmente el ABA (Finch-Savage y Leubner-Metzger, 2006). Suele distinguirse si los inhibidores se encuentran en el eje embrional o, como en el caso de manzana (*Malus sylvestris* Mill.), en los cotiledones (Thévenot, 1982). Sin embargo, los reportes de este tipo de dormición no son abundantes. La idea de que los embriones interactúen con las cubiertas ha ganado espacio como hipótesis para explicar la dormición. En cebada, se ha demostrado que la hipoxia artificial o impuesta por las cubiertas afectó la respuesta de los embriones al ABA exógeno como inhibidor a la germinación (Benech-Arnold et al., 2006). Por otro lado, se sugirió que los diferentes tejidos de los cariopses de *Setaria faberii* Herm. ejercen una regulación particular e independiente entre sí sobre la germinación del embrión (Dekker et al., 1996).

I.B.3. Rol del ácido abscísico y las giberelinas sobre la dormición y la germinación

Diversos trabajos y revisiones señalan al ácido abscísico (ABA) como la hormona que induce y mantiene la dormición de las semillas y las giberelinas (GAs) como las promotoras de la germinación (Hilhorst, 1995, Bewley, 1997, Foley, 2001, Kermode, 2005, Finch-Savage y Leubner-Metzger, 2006). Esta conclusión surge a partir de estudios realizados mayoritariamente sobre especies modelo, como arábidopsis, tomate, tabaco (*Nicotiana* spp.), girasol (*Helianthus annuus* L.), cebada (*Hordeum vulgare* L.), y avenas (*Avena sativa* L. y *A. fatua*), donde se compararon fenotipos contrastantes en su dormición o mutantes con alteraciones en la síntesis, degradación y sensibilidad a estas hormonas. Para algunos autores, la dormición de las semillas estaría dictado por la relación ABA:GAs, tanto en su contenido endógeno en imbibición como la sensibilidad de los embriones a estas hormonas (Finch-Savage y Leubner-Metzger, 2006). Sin embargo, el número de especies donde se ha comprobado este modelo de regulación es escaso, y además presentan un nivel de dormición bajo en comparación con especies silvestres (Cohn, 1996, Bewley, 1997).

El ABA resulta determinante en el desarrollo de la semilla, porque promueve la acumulación de reservas y la adquisición de la tolerancia a la desecación, a la vez que no permite al embrión continuar su crecimiento (Kermode, 2005). Se ha

asociado el contenido de ABA endógeno durante el desarrollo con la dormición inicial que presentan las semillas al momento de ser cosechadas, conocida como dormición primaria. Por ejemplo, mutantes *aba* de *arabidopsis* (deficientes en la síntesis de ABA) no presentan dormición en sus semillas maduras (Hilhorst, 1995). Aunque el contenido de ABA endógeno en semillas secas no se correlaciona con la dormición expresada, las semillas durmientes de diversas especies sintetizan *de novo* la hormona una vez puestas en imbibición (Le Page-Degivry y Garello, 1992, Jacobsen et al., 2002, Ali-Rachedi et al., 2004, Benech-Arnold et al., 2006). Mientras tanto, semillas no durmientes degradan el ABA endógeno al ser puestas en imbibición. Se ha registrado mayor expresión del gen que codifica la ABA 8'-hidroxilasa (enzima que degrada ABA) en semillas no durmientes de *arabidopsis* y cebada, permitiendo el descenso en el contenido de ABA endógeno (Millar et al., 2006).

Sin embargo, en otras especies se ha sugerido que el contenido de ABA endógeno no estaría asociado con el nivel de dormición. No se registraron diferencias en el ABA endógeno entre semillas durmientes y no durmientes embebidas de *Lolium rigidum* Gaud. (Goggin et al., 2009), ni entre cariopsis de arroz rojo (*Oryza sativa* L. f. *spontanea* Roshev.) con diferentes niveles de dormición (Gianinetti y Vernieri, 2007). Tampoco se logra una disminución en la dormición de semillas de *Amaranthus tuberculatus* (Moq.) J.D. Sauer al utilizar inhibidores de la síntesis de ABA (Leon et al., 2007). Estas especies presentan dormición más profunda, la cual requiere de condiciones particulares para lograr germinar. A partir de estos resultados, se ha postulado la existencia de factores específicos de la dormición aún no descubiertos, con los cuales el ABA interactuaría modulando la respuesta (Gianinetti y Vernieri, 2007), a la vez que concluyen que el ABA endógeno participaría en el control de la germinación, pero no incidiría sobre el nivel de la dormición (Leon et al., 2007, Goggin et al., 2009).

Por otra parte, si el ABA es aplicado exógenamente, la hormona no incide sobre el nivel de dormición (Le Page-Degivry y Garello, 1992, Hilhorst, 1995). Las semillas muestran mayor inhibición de la germinación ante concentraciones mayores de ABA

exógeno y este efecto se anula al trasladar las semillas a un sustrato sin ABA. La hormona evita la germinación al mantener baja la extensibilidad de las paredes del embrión (Schopfer y Plachy, 1984, 1985). Evaluar la respuesta germinativa ante concentraciones crecientes de ABA es conocido como sensibilidad al ABA. Se ha demostrado que semillas con mayor nivel de dormición presentan una inhibición de la germinación a concentraciones de ABA menores que las requeridas para inhibir la germinación de semillas sin dormición, tanto en especies modelo (Walker-Simmons, 1987, Romagosa et al., 2001) como en especies silvestres (Gianinetti y Vernieri, 2007, Goggin et al., 2009). Por tanto, se ha señalado a la sensibilidad al ABA como indicador del nivel de dormición para una población de semillas (Finch-Savage y Leubner-Metzger, 2006).

Las GAs son conocidas por promover la germinación de varias especies. Actúan incrementando el potencial de crecimiento del embrión y debilitando los tejidos que lo envuelven (Bewley, 1997). Debido a que mutantes de *arabidopsis* con alteración en la síntesis de GAs presentan problemas para germinar, se ha inferido que estas hormonas inciden sobre la disminución en el nivel de dormición (Kermode, 2005, Finch-Savage y Leubner-Metzger, 2006). Sin embargo, existen evidencias en semillas de cebada, *arabidopsis*, *Avena fatua* y *Sisymbrium officinale* (L.) Scop., donde no se registró una relación entre la dormición y el contenido de GAs endógeno (Derx y Karssen, 1993a, 1993b, Fennimore y Foley, 1998, Jacobsen et al., 2002). Estos autores concluyen que las GAs participarían en la germinación, pero no sobre el nivel de dormición.

I.B.4. Características ecofisiológicas de la dormición

En regiones templadas, las semillas que forman parte del banco del suelo germinan mostrando una periodicidad estacional dependiendo de la especie, el ciclo de vida (anual o perenne) y la adaptación al clima (Baskin y Baskin, 2000). La causa de la emergencia estacional se debe a la variación del nivel de dormición durante el año (Benech-Arnold et al., 2000). Para entender esto, supongamos que las semillas se dispersan de la planta madre con un alto nivel de dormición. Este nivel inicial va

disminuyendo por determinados factores ambientales hasta que alcanza un bajo nivel de dormición. Pero si la semilla no logra germinar, puede volver a imponerse una dormición ya estando dispersa, conocida como dormición secundaria, si existen factores de ambiente que induzcan este proceso (Batlla y Benech-Arnold, 2010).

Otro aspecto a destacar es que el nivel de dormición hace referencia a una población de semillas. Dentro de una población puede encontrarse variabilidad en el nivel de dormición de cada semilla que compone el lote, mostrando una distribución que se asemejaría a una normal (Bradford, 2002). Esta variación sería mayor en especies silvestres que en domesticadas (Batlla y Benech-Arnold, 2010). Basados en que la dormición es un fenómeno poblacional, se han desarrollado modelos de umbral con base poblacional, los cuales han demostrado ser un marco adecuado para inferir el nivel de dormición de una población de semillas y pronosticar su emergencia a campo (Chantre et al., 2009, Meyer y Allen, 2009, Batlla y Benech-Arnold, 2010). Un ejemplo de estos es el modelo hidrotermal, el cual propone que la tasa de germinación es proporcional al valor de temperatura y humedad del suelo que supera (o se aparta de) los valores de umbral establecidos para esa población (Bradford, 2002).

En definitiva, el nivel de dormición de una población de semillas no es fijo y se puede modificar por factores que afectan el nivel de dormición. Como ya se mencionó en I.B.1., no hay una forma directa de medir el nivel de dormición, pero se pueden apreciar cambios o diferencias al ensayar la germinación de las semillas en un rango de temperaturas, potenciales hídricos o factores que terminan la dormición (o promueven la germinación, dependiendo del autor).

I.B.4.a. Factores que afectan el nivel de dormición

El nivel de dormición inicial se define al final del desarrollo sobre la planta madre. Existe una influencia del genotipo, debido a que es una característica heredable que está bajo control multigénico, por ejemplo: se han detectado QTLs asociados a la dormición en arábido (Bentsink y Koornneef, 2011) y en cebada (Li et al., 2003, Castro et al., 2010). Al igual que otras características cuantitativas, el nivel de

dormición inicial es afectado por factores ambientales como la temperatura, el fotoperíodo, la calidad de luz y el estatus nutricional e hídrico durante el desarrollo (Roach y Wulff, 1987, Fenner, 1991). La temperatura sería el factor de mayor importancia: se ha reportado que altas temperaturas durante el desarrollo resultan en niveles de dormición más bajos en diversas especies (Baskin y Baskin, 2000). Dada la influencia del genotipo y del ambiente sobre la dormición, es probable que exista variabilidad intra-específica e intra-poblacional. Milberg y Andersson (1998) demostraron diferencias en el comportamiento germinativo entre poblaciones en 23 de 33 especies de malezas evaluadas, y en algunos casos pueden encontrarse diferencias dentro de poblaciones tan grandes como entre poblaciones (Jones y Nielson, 1999). Muchas veces estas diferencias están relacionadas con factores ecológicos y evolutivos. Ecotipos de regiones con altas precipitaciones (1500 mm anual) de *Digitaria milanjana* (Rendle) Stapf. presentaron baja dormición, mientras que ecotipos de regiones con bajas precipitaciones (630 mm) presentan mayor nivel de dormición (Hacker, 1984).

Las semillas maduras, una vez dispersadas de la planta madre, pueden presentar una disminución en su nivel de dormición conocida como posmaduración, que depende de las condiciones ambientales y del genotipo (Foley, 2001). Sin embargo, si las condiciones ambientales no son las adecuadas, se promoverá el proceso inverso, o sea, la inducción de dormición secundaria (Batlla y Benech-Arnold, 2010). En diversas especies, se ha promovido la posmaduración al colocar las semillas en condiciones frías y húmedas durante semanas, tratamiento conocido como estratificación en frío (*chilling*), o en condiciones secas y cálidas durante meses, conocido como posmaduración en seco (*dry after-ripening*) (Bewley y Black, 1994). A pesar de ser condiciones contrastantes, se ha reportado que tanto la estratificación en frío como la posmaduración en seco lograron disminuir la dormición en diversas especies, entre ellas *arabidopsis* y en *Panicum virgatum* L., especie gramínea estival (Derx y Karssen, 1993b, Sarath y Mitchell, 2008).

La posmaduración en seco se puede lograr mediante el almacenamiento de las semillas en un lugar con baja humedad. En este ambiente, temperaturas más altas

aceleran la posmaduración, mientras que las bajas temperaturas mantienen el nivel de dormición inicial (Zarnstroff et al., 1994, Allen et al., 1995, Kalmbacher et al., 1999), aunque el contenido de agua de las semillas debe encontrarse dentro de determinado rango (entre 7 y 22 % en *Avena fatua*) (Foley, 1994). Aún no está claro cómo es que sucede la posmaduración en seco. Se ha sugerido la participación de reacciones oxidativas no enzimáticas, pero también se ha comprobado que existen cambios en la expresión de genes asociados a la dormición en semillas posmaduradas (Li y Foley, 1996, Carrera et al., 2008, Holdsworth et al., 2008). Por otra parte, la estratificación en frío se lleva a cabo en temperaturas entre 1 y 10 °C, y en algunos casos hasta 15 °C, y estas condiciones disminuyen el nivel de dormición (Bewley y Black, 1994). Mientras tanto, la estratificación a temperaturas mayores provocan una inducción de la dormición secundaria (Batlla y Benech-Arnold, 2010), excepto casos particulares, como *Acanthocarpus preissii* Lehm. cuyas semillas requieren una estratificación de siete semanas con temperaturas cálidas (18 / 33 °C en alternancia) para lograr un bajo nivel de dormición (Turner et al., 2006). El mecanismo de cómo la estratificación provoca posmaduración se ha estudiado sólo para los casos de estratificación en frío y se lo vincula con promover la síntesis de GAs (Holdsworth et al., 2008).

I.B.4.b. Factores que terminan la dormición o inducen la germinación

Exponer las semillas a la luz, a un sustrato con nitrato o a una alternancia de temperaturas provoca un incremento de la germinación. Para algunos autores, la presencia de estos factores terminan la dormición (Benech-Arnold et al., 2000), mientras que otros afirman que promueven la germinación (Vleeshouwers et al., 1995). A pesar de esta discusión, hay consenso en la relación entre estos factores y el nivel de dormición: semillas con mayor sensibilidad a factores que inducen la germinación determina un nivel de dormición menor de la población en estudio, y viceversa (Benech-Arnold et al., 2000). En una visión ecológica, la presencia de estos factores le brindan a las semillas información sobre si su microambiente inmediato es favorable para la germinación (Finch-Savage y Leubner-Metzger, 2006).

La luz y el nitrato son factores que incrementan la germinación, y en especies como *arabidopsis* (Derkx y Karssen, 1994, Alboresi et al., 2005) y *Sisymbrium officinale* (Derkx y Karssen, 1993a) se demostraron cambios en la respuesta germinativa ante estos factores según el nivel de dormición de las semillas. Se conoce que la luz promueve la germinación a través de los fitocromos por medio de respuestas de baja y muy baja fluencia (LFR y VLFR) (Casal y Sánchez, 1998), mientras que se ha propuesto que el nitrato la promueve por interactuar con los fitocromos (Batak et al., 2002) o por producir óxido nítrico, el cual se ha vinculado con el control de la germinación (Sarath et al., 2006, El-Maarouf-Bouteau y Bailly, 2008). Por otra parte, varias especies requieren alternancia de temperaturas para germinar (Williams, 1983, Baskin y Baskin, 2000). Un nivel de dormición bajo está asociado a menores requerimientos de temperaturas alternantes para promover la germinación, en términos de las características de cada ciclo (temperatura máxima y mínima, amplitud, velocidad del pasaje) y en el número de ciclos necesarios (Benech-Arnold et al., 2000). Los tratamientos que provocan posmaduración han resultado en semillas con menores requerimientos de temperaturas alternantes en *Sorghum halepense* (L.) Pers. (Benech-Arnold et al., 1990) y *Lolium rigidum* (Goggin et al., 2009). También, se notaron requerimientos de temperaturas alternantes diferentes al comparar genotipos con distintos niveles de dormición (Leon et al., 2007).

En diversas especies herbáceas, se recomienda un corto período de imbibición (pre-imbibición) en bajas temperaturas y oscuridad, conocido como “pre-*chilling*”, lo cual permite un incremento en la germinación en condiciones inductivas posteriores. Para semillas de gramíneas estivales se recomienda 14 días en temperaturas dentro de un rango de 4 a 10 °C (Taylorson, 1975, Williams, 1983, Zarnstroff et al., 1994, Sarath y Mitchell, 2008), mientras que para *arabidopsis* sólo se requiere una semana a 4 °C (Derkx y Karssen, 1993b). En algunos casos, se lograron mejores resultados en temperaturas templadas que frías, como lo reportado en semillas de *Andropogon gerardii* Vitman, que con una pre-imbibición de 2 días a 17 °C mostraron mayor emergencia a campo que con el “pre-*chilling*” recomendado (14 días, 4 °C) (Beckman et al., 1993). A pesar de que este tratamiento es una estratificación de

corta duración, no se ha desarrollado una discusión sobre si la germinación se incrementa porque se modifica el nivel de dormición, o simplemente se promueve la germinación. Existen evidencias donde los tratamientos de pre-imbibición logran emular el efecto promotor de la germinación de la luz y de las temperaturas alternantes por separado (Williams, 1983, Schrauf et al., 1995), y otras donde la respuesta germinativa al pre-*chilling* se incrementó ante factores que promueven la disminución del nivel de dormición (Glison et al., 2011).

I.C. OBJETIVOS

I.C.1. Objetivo general

Estudiar el comportamiento germinativo y la dormición por cubiertas de semillas de diferentes genotipos de *P. dilatatum*, que representan a la diversidad genética natural de la especie, para identificar si existe variabilidad intra-específica en las características fisiológicas mencionadas, para obtener información que pueda ser útil para el proceso de domesticación.

I.C.2. Objetivos específicos

Estudiar la variabilidad en el comportamiento germinativo entre semillas de dieciséis genotipos de *P. dilatatum*, evaluando la respuesta germinativa a dos tratamientos de pre-imbibición ya ensayados en la especie (pre-*chilling* y a 20 °C) como factores que promueven la germinación, y la respuesta de éstos al tiempo de almacenamiento en seco y al momento de cosecha de las semillas como factores que provocan posmaduración (Capítulo II).

Estudiar si existen diferencias entre siete genotipos de comportamientos germinativos contrastantes en el grado de incidencia de las cubiertas sobre la germinación y la imbibición de las semillas, utilizando semillas con escarificación ácida y con la extracción manual de la lema. Además, se determinará si dicha incidencia se modifica ante la posmaduración provocada por el almacenamiento en seco (Capítulo III).

II. LA VARIABILIDAD EN EL COMPORTAMIENTO GERMINATIVO DE SEMILLAS DE *PASPALUM DILATATUM* POIR. ES DEPENDIENTE DEL GENOTIPO.^a

Glison, Nicolás¹, Viega, Luis¹ y Speranza, Pablo²

1: Laboratorio de Fisiología Vegetal, Departamento de Biología Vegetal, Facultad de Agronomía, Universidad de la República, Montevideo, Uruguay. Código postal: 12900.

2: Laboratorio de Evolución y Domesticación de las Plantas, Departamento de Biología Vegetal, Facultad de Agronomía, Universidad de la República, Montevideo, Uruguay. Código postal: 12900.

Correo electrónico del primer autor: nigli@fagro.edu.uy

II.A. RESUMEN

Paspalum dilatatum Poir. es una gramínea estival de interés forrajero, pero sus semillas presentan baja germinación lo cual limita su adopción. Sin embargo, la variabilidad en el comportamiento germinativo para esta especie no ha sido analizada sistemáticamente. Las semillas de *Paspalum* spp. presentan dormición, y existen tratamientos efectivos para levantarla, como el almacenamiento en seco y la pre-imbibición. El momento de cosecha también incide en la dormición de las semillas. En este trabajo, se evaluó la respuesta germinativa de semillas de dieciséis genotipos de *P. dilatatum*, que representan la variabilidad genética natural conocida para la especie, a tres tratamientos de pre-imbibición (a 5 y 20 °C, y sin pre-imbibición), y tres tiempos de almacenamiento (0, 3 y 6 meses). Se evaluaron tres momentos de

^a El formato de las citas y referencias bibliográficas del presente capítulo se adecua a lo requerido en la revista Agrocencia.

cosecha (otoño 2011, verano 2012 y otoño 2012) para cada genotipo. La pre-imbibición a 20 °C mostró porcentajes de germinación mayores al 80 % para todos los genotipos. Estas proporciones resultaron iguales o mayores a las registradas con pre-imbibición a 5 °C, sugiriendo que el frío no sería un factor esencial para terminar la dormición. Hubo un incremento en la respuesta germinativa con almacenamientos más prolongados para la mayoría de los genotipos, mientras que otros no mostraron ningún efecto. Los biotipos Virasoro y Chirú registraron un comportamiento germinativo diferente, mostrando mayor germinación en ausencia de pre-imbibición. Los resultados sugieren que es posible seleccionar por características germinativas y que las condiciones óptimas para la germinación deben ajustarse según el genotipo.

Palabras claves: biotipos de *P. dilatatum*, dormición de semillas, pre-chilling, posmaduración, domesticación de cultivos

Variability in germination behaviour of *Paspalum dilatatum* Poir. seeds is genotype dependent.

II.B. SUMMARY

Paspalum dilatatum Poir. is well known summer forage grass, but has low seed germination which hinders its adoption. However, variability in germination behaviour for this species has never been systematically analyzed. Seed dormancy was proposed to occur in *Paspalum* spp. seeds, and treatments such as dry storage and cold or warm pre-imbibition were reported effective to relieve or break seed dormancy. Initial seed dormancy level is also known to change according the harvest date. In the present work, seed germination responses were studied for sixteen *P. dilatatum* genotypes, representing its known natural genetic variability, to three pre-imbibition treatments (at 5 and 20 °C, and without pre-imbibition), and considering three times of seed storage (0, 3 and 6 months). Three harvest dates (fall 2011, summer 2012 and fall 2012) were evaluated for each genotype. Pre-imbibition at 20 °C showed average germination percentages higher than 80% for all biotypes. These rates were equal or higher than those observed after pre-imbibition at 5 °C,

suggesting that cold are not an essential factor to break dormancy. There was an increase in germinative response to longer storage in all the genotypes, except some biotypes that showed no effect. Virasoro and Chirú biotypes showed different germinative behaviour with higher germination rates of untreated freshly harvested seeds. These results suggest that selection can be practised for seed germination traits and that optimal germination conditions should be adjusted for individual genotypes.

Keywords: *P. dilatatum* biotypes, seed dormancy, pre-chilling, after-ripening, crop domestication.

II.C. INTRODUCCIÓN

Las especies silvestres o en estados iniciales del proceso de domesticación frecuentemente presentan dormición de semillas, lo cual impide una emergencia de plantines uniforme (Gepts, 2004). El conocimiento de los factores que levantan la dormición puede ser útil para facilitar la adopción de un nuevo cultivo (Adkins et al., 2002). Además, las especies silvestres poseen una importante variabilidad para esta característica (Baskin y Baskin, 2000), que debe ser tomada en cuenta durante la etapa inicial de selección para escoger el biotipo más adecuado para la domesticación. Sin embargo, no son habituales los trabajos sobre las respuestas germinativas relacionadas a la variabilidad genética natural que presenta una especie pre-domesticada. Diversas gramíneas estivales que son cultivadas para forraje, particularmente de la tribu Paniceae, todavía muestran características de dormición que son similares a sus formas salvajes (Adkins et al., 2002). Entre éstas, el género *Paspalum* contiene varias especies con potencial forrajero y diferentes grados de domesticación.

Paspalum dilatatum Poir. es una gramínea estival perenne, propuesta frecuentemente como forrajera para regiones templadas, porque presenta crecimiento óptimo a temperaturas cálidas (Pearson y Shah, 1981), pero muestra tolerancia a las heladas, sequías e inundaciones (Loreti y Oesterheld, 1996, Campbell et al., 1999), que la convierten en un cultivo forrajero con el potencial adecuado para regiones donde las condiciones invernales son demasiado severas para otras gramíneas estivales

forrajeras. Sin embargo, presenta una importante limitante en el bajo establecimiento, atribuido a una baja germinación (Schrauf et al., 1995). Se ha reportado variabilidad genética natural en su área de origen (sureste de América del Sur), que incluye al biotipo pentaploide apomítico “común” (Burson, 1991), tetraploides sexuales (Hickenbick, 1992, Speranza, 2009), hexaploides apomíticos y otras formas geográficamente restringidas (Burson, 1991, Speranza, 2009). Recientemente, se ha reportado variabilidad genética dentro del biotipo pentaploide (Machado et al., 2005, Speranza, 2005a). Existen evidencias que demuestran diferencias fenotípicas entre los biotipos, incluyendo el tamaño de tallos e inflorescencias (García et al., 2007), la producción de forraje y la tolerancia al pastoreo (Venuto et al., 2003). Del mismo modo, se han reportado diferencias entre algunos biotipos en el porcentaje de semillas viables y en el comportamiento germinativo (Souza-Chies y Cavalli-Molina, 1995, Tischler y Burson, 1999).

La dormición de las semillas se ve modificada por factores de ambiente que interaccionan con el genotipo. El nivel inicial de la dormición de las semillas puede cambiar según el momento de cosecha, debido a diferencias en el ambiente durante el desarrollo de la semilla (Fenner, 1991). *P. dilatatum* libera semillas viables durante el verano y el otoño (Pizarro, 2000), y se han reportado diferencias en el comportamiento germinativo entre semillas colectadas en diferentes fechas (Tischler y Burson, 1999). Se han propuesto varios tratamientos para levantar o terminar la dormición en semillas de *Paspalum* spp., como ser: escarificación ácida y mecánica, luz y temperaturas alternantes (Fulbright y Flenniken, 1988, West y Marousky, 1989, Schrauf et al., 1995). El almacenamiento en seco resultó efectivo para incrementar la germinación de semillas de *P. notatum* Flügge (Maeda et al., 1997) y *P. atratum* Swallen. (Kalmbacher et al., 1999). El almacenamiento causa posmaduración en varias especies (Foley, 2001), el cual se refleja en una mayor sensibilidad a factores que terminan la dormición o inducen la germinación (Batlla y Benech-Arnold, 2010). La pre-imbibición en frío (pre-*chilling*) fue propuesta como un tratamiento que termina la dormición en *P. dilatatum* (Johnston y Miller, 1964, Schrauf et al., 1995), y en otras paníceas, como *Panicum virgatum* L. (Zarnstroff et al., 1994), *Andropogon*

gerardi Vitman (Beckman et al., 1993) y *Sorghastrum nutans* (L.) Nash (Hsu et al., 1985). Sin embargo, se han observado resultados donde el pre-*chilling* no promueve la germinación en semillas de *P. atratum* (Kalmbacher et al., 1999). Por otra parte, Schrauf et al. (1995) no registraron diferencias entre una pre-imbibición en frío y otra con temperaturas más cálidas. En el presente trabajo, se estudió si existen diferencias en la respuesta germinativa entre genotipos seleccionados de *P. dilatatum* que representan la variabilidad genética natural de la especie. Para esto, se ensayaron tratamientos de pre-imbibición comúnmente recomendados (frío y templado), y se analizó la respuesta germinativa ante incrementos en el tiempo de almacenamiento y su interacción con los diferentes genotipos. También, se evaluaron los efectos de tres fechas de cosecha sobre el comportamiento germinativo.

II.D. MATERIALES Y MÉTODOS

II.D.1. Material vegetal, cosecha de semillas y condiciones de almacenamiento

Las plantas de dieciséis genotipos de *P. dilatatum* se obtuvieron a partir de semillas del Banco de Germoplasma de la Facultad de Agronomía (Universidad de la República, Uruguay), representando la variabilidad genética natural reportada por Speranza (2005a y 2005b). La colección incluyó varios clones pentaploides apomícticos, los biotipos hexaploides Chirú y Uruguaiana, y una línea pura de los biotipos sexuales Virasoro y ssp. *flavescens* (Tabla II.1). Cinco plantas individuales por genotipo fueron cultivadas en macetas (22 cm de diámetro, 19 cm de profundidad) dentro de un invernáculo de Facultad de Agronomía (Montevideo, Uruguay) durante tres años (2009 al 2012). Las semillas se cosecharon en marzo - abril de 2011 (otoño 2011), en enero de 2012 (verano 2012) y en abril de 2012 (otoño 2012), se limpiaron con una sopladora y se seleccionaron a mano para descartar espiguillas vacías o con esclerocios de *Claviceps*, para luego almacenarlas en sobres de papel dentro de una cámara cerrada en oscuridad y sin control de temperatura. Se muestrearon semillas de cada lote a cero (recién cosechadas), tres y seis meses de almacenamiento. Se registró la temperatura promedio de los seis meses

de almacenamiento para cada momento de cosecha, resultando 21 y 19 °C para otoño 2011 y 2012, respectivamente, y 26 °C para verano 2012.

Tabla II.1: Lista de genotipos de *P. dilatatum* seleccionados con su nivel de ploidía, forma de reproducción e identificación de la sub-especie o biotipo correspondiente. Para los clones pentaploides, se especifica el grupo genético al cual corresponden, según Speranza (2005b). Los grupos a, b y c son clones recombinantes, mientras que d son variantes mutacionales del clon “común”.

Etiquetas	Ploidía	Reproducción	Especie / sub-especie / biotipo	Grupo genético
a108	2n = 5x	Apomítico	<i>P. dilatatum</i> ssp. <i>dilatatum</i>	a
a113	2n = 5x	Apomítico	<i>P. dilatatum</i> ssp. <i>dilatatum</i>	a
a62-8	2n = 5x	Apomítico	<i>P. dilatatum</i> ssp. <i>dilatatum</i>	a
b59A	2n = 5x	Apomítico	<i>P. dilatatum</i> ssp. <i>dilatatum</i>	b
b67	2n = 5x	Apomítico	<i>P. dilatatum</i> ssp. <i>dilatatum</i>	b
b73-7	2n = 5x	Apomítico	<i>P. dilatatum</i> ssp. <i>dilatatum</i>	b
c19-1	2n = 5x	Apomítico	<i>P. dilatatum</i> ssp. <i>dilatatum</i>	c
c33-1	2n = 5x	Apomítico	<i>P. dilatatum</i> ssp. <i>dilatatum</i>	c
c44	2n = 5x	Apomítico	<i>P. dilatatum</i> ssp. <i>dilatatum</i>	c
d111	2n = 5x	Apomítico	<i>P. dilatatum</i> ssp. <i>dilatatum</i>	d
d58-2	2n = 5x	Apomítico	<i>P. dilatatum</i> ssp. <i>dilatatum</i>	d
d59C	2n = 5x	Apomítico	<i>P. dilatatum</i> ssp. <i>dilatatum</i>	d
ssp. <i>flavescens</i>	2n = 4x	Sexual	<i>P. dilatatum</i> ssp. <i>flavescens</i>	
Virasoro	2n = 4x	Sexual	<i>P. dilatatum</i> biotipo Virasoro	
Chirú	2n = 6x	Apomítico	<i>P. dilatatum</i> biotipo Chirú	
Uruguaiana	2n = 6x	Apomítico	<i>P. dilatatum</i> biotipo Uruguaiana	

II.D.2. Ensayos de germinación y tratamientos de pre-imbibición

Para cada réplica, fueron utilizadas treinta semillas, con tres réplicas para cada tratamiento. La germinación se llevó a cabo sobre papel de filtro humedecido, dentro de placas plásticas de Petri de 10 cm. Inicialmente, el papel de filtro fue humedecido con una solución de 0,02 M de KNO₃ (0,2 % m/v) y luego con agua destilada cuando fue necesario durante la incubación. Los tratamientos de pre-imbibición en frío (5 °C) se realizaron colocando las placas de Petri con las semillas humedecidas dentro

en un refrigerador por 7 días en oscuridad. Los tratamientos de pre-imbibición templada (20 °C) se realizaron colocando las placas de Petri con las semillas humedecidas en una cámara con temperatura controlada durante 7 días en oscuridad. Luego, las placas de Petri fueron transferidas a una cámara de incubación con luz fluorescente ($15 - 20 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$), a 32 °C constante durante 14 días, de acuerdo a lo efectuado por Maeda et al. (1997). Los tratamientos sin pre-imbibición se realizaron colocando las placas de Petri con las semillas humedecidas directamente dentro de la cámara de incubación. Al final de cada ensayo de germinación, las semillas que no germinaron fueron sometidas al test de tetrazolio para evaluar su viabilidad, de acuerdo a Maeda et al. (1997), y se calcularon los porcentajes de viabilidad al sumar la proporción de semillas germinadas con la proporción de semillas no germinadas positivas al tetrazolio.

Para comparar el tratamiento de pre-imbibición a 20 °C con condiciones óptimas de germinación, como las sugeridas en las reglas ISTA (1999), semillas recién cosechadas de los lotes de verano 2012 de cuatro clones pentaploides divergentes (a62-8, b67, c33-1, d58-2), de los biotipos Virasoro y Chirú, y de la ssp. *flavescens* fueron puestas a germinar en temperaturas alternantes (20 / 35 °C, oscuridad / luz) durante 14 días, al mismo tiempo que se llevaban a cabo los ensayos con pre-imbibición a 20 °C.

II.D.3. Análisis estadístico

Se usó un diseño de parcelas divididas con análisis factorial para cada momento de cosecha, donde los tratamientos de pre-imbibición, el tiempo de almacenamiento y su interacción fueron los tratamientos principales, mientras que las sub-parcelas fueron los genotipos y las interacciones con los tratamientos principales. Para analizar el efecto del momento de cosecha, se utilizó el mismo diseño substituyendo al tiempo de almacenamiento por el momento de cosecha. Los datos fueron analizados usando el procedimiento GENMOD (SAS 9.2, SAS *Inst.*) con la proporción de semillas germinadas como variable de respuesta, utilizando “Logit” como función link. A través de contrastes ortogonales, diseñados para cada genotipo, se compararon las

respuestas germinativas a los tratamientos de pre-imbibición entre los tiempos de almacenamiento dentro de cada momento de cosecha y entre los momentos de cosecha para semillas recién cosechadas y con seis meses de almacenamiento.

II.E. RESULTADOS

Hubo un efecto de los tratamientos de pre-imbibición sobre la germinación para la mayoría de los genotipos para los tres momentos de cosecha evaluados ($p < 0,05$). Los mayores porcentajes de germinación ($> 80 \%$) se obtuvieron con la pre-imbibición a $20 \text{ }^{\circ}\text{C}$ en casi todos los genotipos y tiempos de almacenamiento, mientras que se registraron proporciones variables para la pre-imbibición en frío, resultando menores para semillas recién cosechadas que para semillas con mayor tiempo de almacenamiento (Figura II.1, II.2 y II.3). En tanto, los porcentajes de germinación más bajos fueron registrados en el tratamiento sin pre-imbibición para los clones pentaploides, la ssp. *flavescens* y el biotipo Uruguiana, mientras que el biotipo Virasoro registró 49% de germinación promedio con el mismo tratamiento. Por otra parte, el biotipo Chirú no mostró diferencias entre los tratamientos de pre-imbibición en ninguna ocasión, registrando siempre altos porcentajes de germinación ($> 60 \%$).

Hubo diferencias estadísticas entre tratamientos de pre-imbibición y tiempos de almacenamiento en la viabilidad de las semillas determinada al final de los ensayos de germinación ($p < 0,05$). En los tratamientos sin pre-imbibición se observó una tendencia a presentar menores porcentajes de viabilidad que con tratamientos de pre-imbibición, aunque estas diferencias nunca fueron superiores al 6% . Sin embargo, en casi todos los ensayos se obtuvieron altos porcentajes de viabilidad promedio ($> 80 \%$). En algunos pocos casos se registraron diferencias entre genotipos ($p > 0,05$). Los biotipos sexuales y Chirú mostraron frecuentemente proporciones de semillas viables mayores al 90% , mientras que las menores proporciones fueron registradas en algunos clones pentaploides cosechados en otoño 2011, como ser: c44, b73-7 y c19-1 ($86, 85$ y 82% respectivamente) No hubo correlación entre los porcentajes de germinación y los de viabilidad.

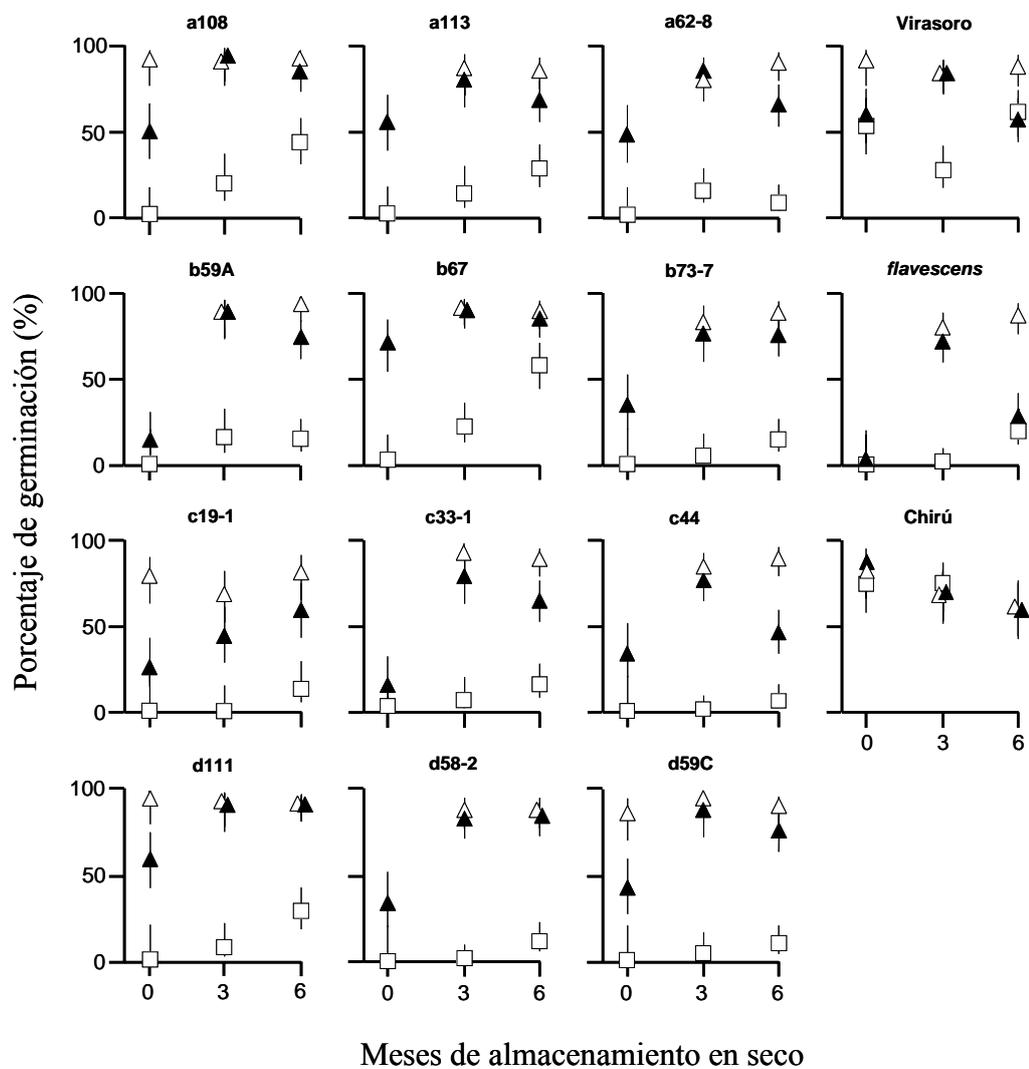


Figura II.1: Porcentaje de germinación de 15 genotipos de *P. dilatatum*, de semillas cosechadas en otoño 2011 con 0 (recién cosechadas), 3 y 6 meses de almacenamiento en seco, ante tres tratamientos de pre-imbibición: pre-imbibición templada (7 d, 20 °C), triángulos vacíos; pre-imbibición en frío (7 d, 5 °C), triángulos llenos; sin pre-imbibición, cuadrados vacíos. Las líneas verticales representan los límites de confianza al 95 %. No hubo datos para el biotipo Uruguaiana, porque su producción de semillas no fue suficiente. Los símbolos faltantes se debieron a fallas en los ensayos.

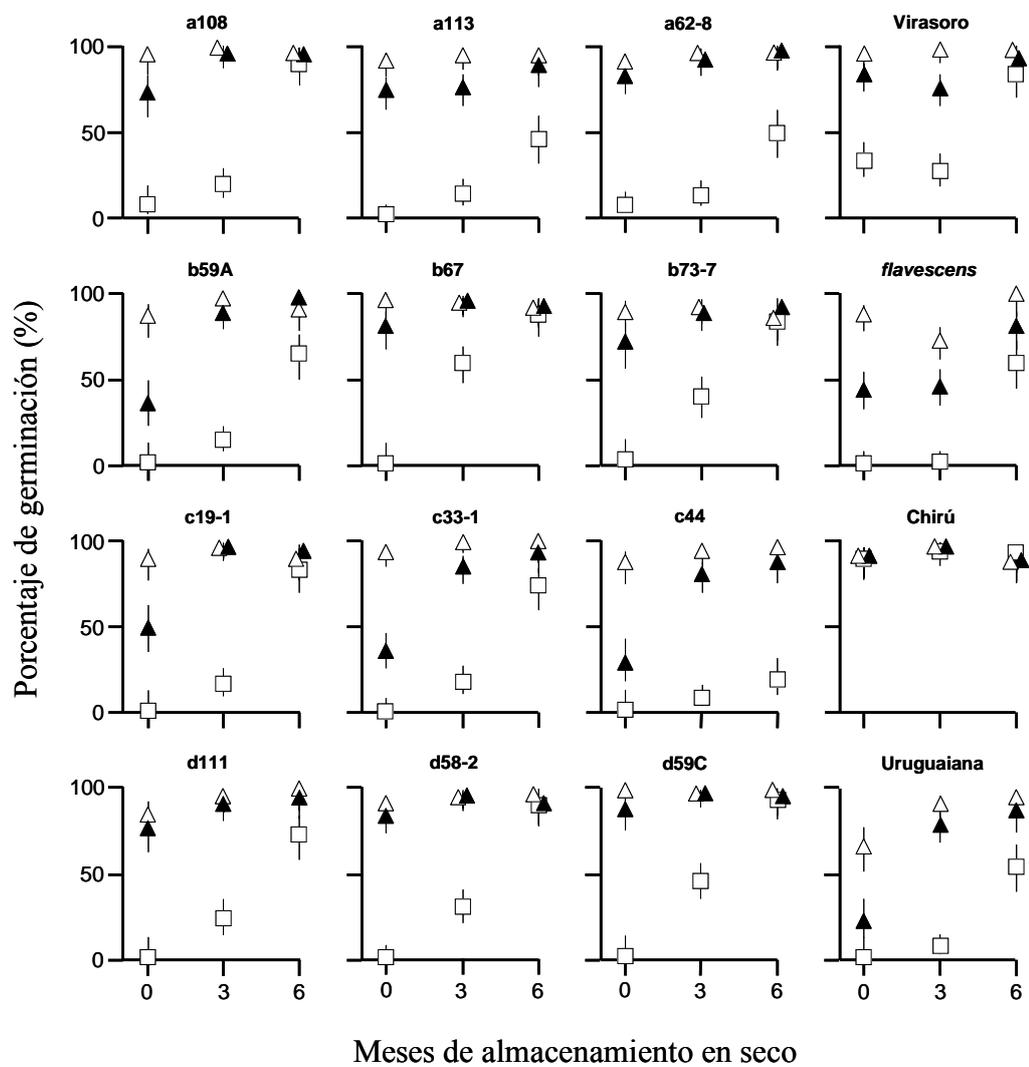


Figura II.2: Porcentaje de germinación de 16 genotipos de *P. dilatatum*, de semillas cosechadas en verano 2012 con 0 (recién cosechadas), 3 y 6 meses de almacenamiento en seco, ante tres tratamientos de pre-imbibición: pre-imbibición templada (7 d, 20 °C), triángulos vacíos; pre-imbibición en frío (7 d, 5 °C), triángulos llenos; sin pre-imbibición, cuadrados vacíos. Las líneas verticales representan los límites de confianza al 95 %.

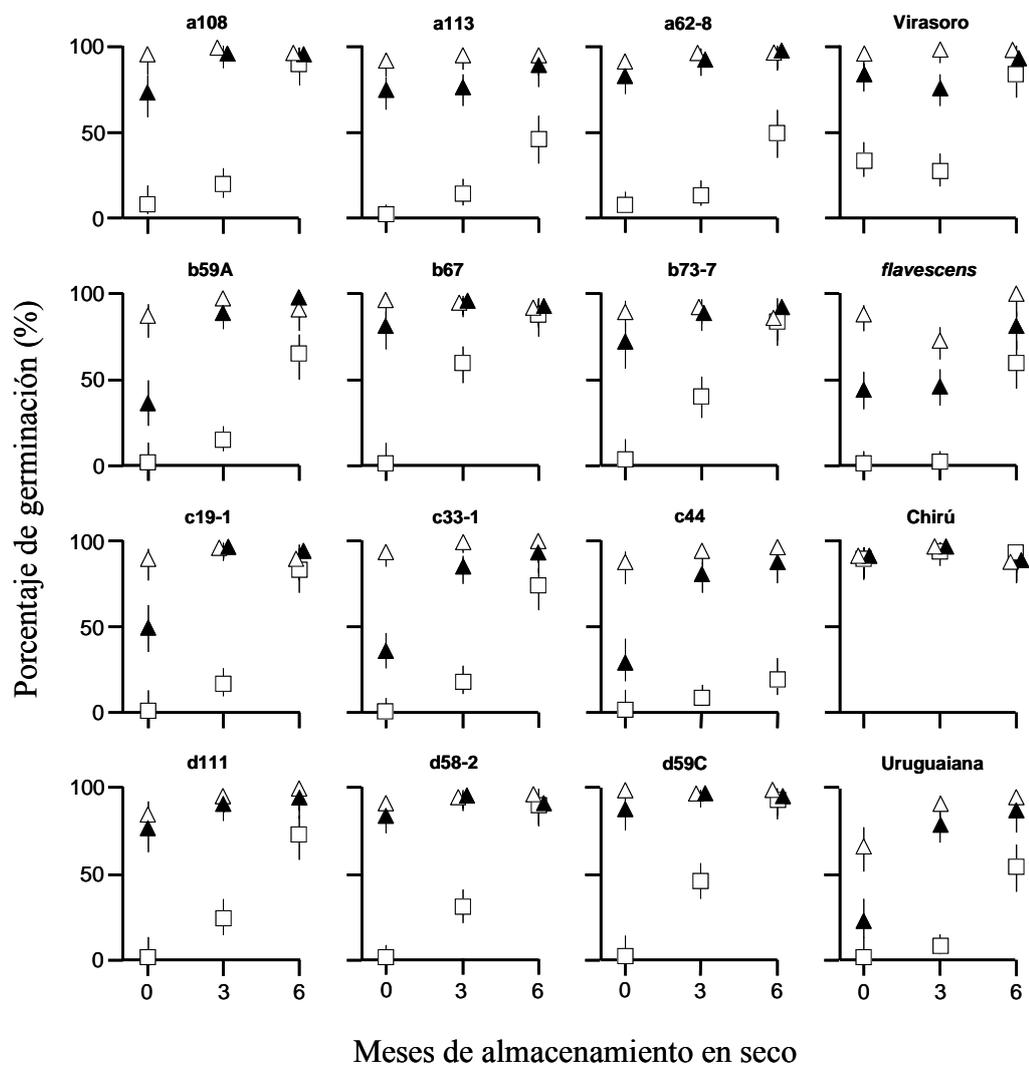


Figura II.3: Porcentaje de germinación de 16 genotipos de *P. dilatatum*, de semillas cosechadas en otoño 2012 con 0 (recién cosechadas), 3 y 6 meses de almacenamiento en seco, ante tres tratamientos de pre-imbibición: pre-imbibición templada (7 d, 20 °C), triángulos vacíos; pre-imbibición en frío (7 d, 5 °C), triángulos llenos; sin pre-imbibición, cuadrados vacíos. Las líneas verticales representan los límites de confianza al 95 %. n.d.: datos de 3 meses de almacenamiento ausentes por una baja producción de semillas de estos genotipos para este momento de cosecha.

El tiempo de almacenamiento afectó la respuesta germinativa de varios genotipos en todos los momentos de cosecha evaluados ($p < 0,05$). Para las semillas cosechadas en otoño 2011, hubo un incremento en la respuesta germinativa para todos los clones pentaploides (excepto para c44) y la ssp. *flavescens* entre 0 y 3 meses de almacenamiento (Tabla II.2), debido principalmente a una mayor respuesta al tratamiento de pre-imbibición en frío (Figura II.1). No se registraron diferencias en los contrastes entre 3 y 6 meses en la mayoría de los genotipos. El biotipo Virasoro no mostró cambios significativos en la respuesta germinativa ante tiempos de almacenamiento mayores (Tabla II.2). Por otra parte, Chirú registró una disminución en la respuesta germinativa entre 0 y 6 meses, manteniendo porcentajes de germinación mayores al 60 % (Figura II.1). Para las semillas cosechadas en verano 2012, se registraron incrementos en la respuesta germinativa entre todos los tiempos de almacenamiento evaluados para todos los clones pentaploides (excepto c44 y b67) y el biotipo Uruguaiana (Tabla II.2), debido a un aumento en la respuesta a la pre-imbibición en frío entre 0 y 3 meses y a un aumento en la germinación con el tratamiento sin pre-imbibición entre 3 y 6 meses (Figura II.2). Para ssp. *flavescens* y biotipo Virasoro no hubo diferencias en la respuesta germinativa entre 0 y 3 meses, pero sí la hubo entre 3 y 6 meses. El biotipo Chirú mantuvo porcentajes de germinación mayores al 80 %, aunque mostró una leve disminución en su respuesta germinativa entre 3 y 6 meses (Tabla II.2). Por último, se registraron incrementos en la respuesta germinativa a los 6 meses de almacenamiento para semillas de los pentaploides cosechados en otoño 2012, excepto para b59A y b73-7 (Tabla II.2). En a113, c44, d58-2 y d59C el incremento se registró en los primeros 3 meses de almacenamiento, mientras que los restantes mostraron incrementos entre 3 y 6 meses, o sólo a los 6 meses. Nuevamente, los incrementos en la respuesta germinativa se debieron a mayor germinación en los tratamientos de pre-imbibición en frío y sin pre-imbibición (Figura II.3). Los biotipos Chirú y ssp. *flavescens* no mostraron diferencias con el almacenamiento, mientras que el biotipo Virasoro registró una disminución en su respuesta germinativa entre 0 y 3 meses, pero manteniendo porcentajes de germinación mayores al 40 % con el tratamiento sin pre-imbibición. El biotipo Uruguaiana presentó un incremento en la respuesta germinativa entre 0 y 3 meses,

debido a un aumento en la respuesta a la pre-imbibición a 20 °C porque las semillas recién cosechadas mostraron los más bajos porcentajes de germinación para este tratamiento (Figura II.3).

Tabla II.2: Incrementos (I) o disminuciones (D) estadísticamente significativos ($p < 0,05$) en las respuestas germinativas a los tratamientos de pre-imbibición para cada genotipo de *P. dilatatum* evaluado, entre los diferentes meses de almacenamiento en seco (0, 3 y 6), testeado por contrastes ortogonales.

Genotipo	otoño 2011 comparación almacenamiento			verano 2012 comparación almacenamiento			otoño 2012 comparación almacenamiento		
	0 vs 3	0 vs 6	3 vs 6	0 vs 3	0 vs 6	3 vs 6	0 vs 3	0 vs 6	3 vs 6
a108	I	I	NS	I	I	I	n.d.	I	n.d.
a113	I	I	NS	I	I	I	I	I	NS
a62-8	I	I	NS	I	I	I	NS	I	NS
b59A	I	I	NS	I	I	I	NS	NS	NS
b67	I	I	NS	I	I	NS	NS	I	I
b73-7	I	I	NS	I	I	I	n.d.	NS	n.d.
c19-1	NS	I	I	I	I	I	NS	I	I
c33-1	I	I	NS	I	I	I	NS	I	I
c44	NS	NS	NS	I	I	NS	I	I	NS
d111	I	I	NS	I	I	I	NS	I	NS
d58-2	I	I	NS	I	I	I	I	I	NS
d59C	I	I	NS	I	I	I	I	I	NS
<i>ssp. flavescens</i>	I	I	NS	NS	I	I	NS	NS	NS
Virasoro	NS	NS	NS	NS	I	I	D	D	NS
Chirú	NS	D	NS	I	NS	D	n.d.	NS	n.d.
Uruguiana	n.d.	n.d.	n.d.	I	I	I	I	I	NS

NS = contraste no significativo.

n.d.: el contraste no se realizó debido a la ausencia de alguno o todos los datos.

No hubo diferencias en la respuesta germinativa entre los momentos de cosecha (otoño 2011, verano 2012 y otoño 2012) para semillas recién cosechadas, excepto para los clones pentaploides a108, a62-8, y los biotipos Virasoro y Chirú (Tabla II.3), los cuales mostraron mayor respuesta germinativa en los lotes de verano 2012. Por otra parte, se registró mayor respuesta germinativa en los lotes cosechados en verano que en los de otoño cuando las semillas tuvieron 6 meses de almacenadas en todos

Tabla II.3: p-valores de los contrastes ortogonales entre los diferentes momentos de cosecha (otoño 2011, verano 2012 y otoño 2012) para cada genotipo de *P. dilatatum*, considerando la respuesta germinativa a los tratamientos de pre-imbibición evaluados, tanto para semillas recién cosechadas como con 6 meses de almacenamiento.

Genotipo	Recién cosechadas			Seis meses de almacenamiento		
	otoño 2011	otoño 2012	verano 2012	otoño 2011	otoño 2011	verano 2012
	vs verano 2012	vs otoño 2012	vs otoño 2012	vs verano 2012	vs otoño 2012	vs otoño 2012
a108	0,034	0,885	0,038	0,001	0,192	< 0,001
a113	0,854	0,554	0,401	0,003	0,038	0,398
a62-8	0,003	0,233	0,122	< 0,001	0,064	0,001
b59A	0,573	0,288	0,445	< 0,001	0,099	< 0,001
b67	0,667	0,648	0,506	0,017	0,002	< 0,001
b73-7	0,144	0,063	0,729	< 0,001	0,658	< 0,001
c19-1	0,406	0,119	0,579	< 0,001	0,042	< 0,001
c33-1	0,512	0,797	0,857	< 0,001	0,691	< 0,001
c44	0,880	0,823	0,677	< 0,001	0,513	0,002
d111	0,911	0,788	0,701	0,001	0,084	< 0,001
d58-2	0,386	0,271	0,765	< 0,001	0,161	< 0,001
d59C	0,090	0,596	0,187	< 0,001	0,046	< 0,001
ssp. <i>flavescens</i>	0,272	0,174	0,914	< 0,001	0,086	< 0,001
Virasoro	0,326	< 0,001	0,004	< 0,001	0,401	0,001
Chirú	0,044	0,592	0,019	< 0,001	0,088	0,003
Uruguaiana	n.d.	n.d.	0,607	n.d.	n.d.	< 0,001

Los contrastes significativos ($p < 0,05$) fueron resaltados en negrita.

n.d.: el contraste no se realizó debido a la ausencia de alguno o todos los datos.

los genotipos evaluados (excepto a113 al comparar verano y otoño de 2012). No se registraron diferencias entre los dos lotes cosechados en otoño, a excepción de los clones pentaploides a113, b67, c19-1 y d59C (Tabla II.3). Por último, no se registraron diferencias en el porcentaje de germinación entre semillas en temperaturas alternantes y con pre-imbibición a 20 °C, mostrando proporciones altas en ambos casos (93 y 92 % respectivamente).

II.F. DISCUSIÓN

Ambos tratamientos de pre-imbibición promovieron la germinación en casi todos los genotipos y tiempos de almacenamiento evaluados, mientras que se registraron bajas proporciones de semillas germinadas en las condiciones de incubación ensayadas sin pre-imbibición (32 °C y luz constante), pero mostrando incrementos germinativos ante almacenamientos más prolongados, al igual que lo reportado para condiciones similares en *P. notatum* (Maeda et al., 1997). La pre-imbibición en frío, referido en otros trabajos como *chilling* o *pre-chilling*, ha sido ampliamente utilizado en diversas especies como tratamiento para terminar la dormición (Kermode, 2005). En nuestro trabajo, el referido tratamiento mostró una germinación variable en diferentes genotipos, así como incrementos en la germinación ante tiempos de almacenamiento mayores, pero nunca logró registrar porcentajes de germinación mayores que el tratamiento de pre-imbibición templada (20 °C), el cual resultó ser el tratamiento con mejor respuesta germinativa para todos los genotipos (Figuras II.1, II.2 y II.3). En trabajos previos realizados en ssp. *flavescens* se observaron resultados similares (Glison et al., 2011). Estos resultados sugieren que el frío puede no ser un factor esencial para terminar la dormición en esta especie, sino que sería el tratamiento de pre-imbibición en sí mismo, similar a lo que ha sido sugerido por Schrauf et al. (1995). Esta respuesta resulta congruente con observaciones donde condiciones de inundación al final del verano lograron promover la emergencia de *P. dilatatum* (Cornaglia et al., 2009). La eficiencia similar del tratamiento con temperaturas alternantes y de pre-imbibición a 20 °C seguido por altas temperaturas constantes sugiere que la pre-imbibición a temperaturas templadas podría ser suficiente para terminar la dormición y que la alternancia de la temperatura no sería estrictamente

necesario para *P. dilatatum* como ha sido reportado en otras especies (Benech-Arnold et al., 2000).

Tiempos de almacenamiento mayores causaron incrementos en la respuesta germinativa a los tratamientos de pre-imbibición ensayados, debido probablemente a la posmaduración de las semillas, o sea, un nivel de dormición menor (Batlla y Benech-Arnold, 2010). A pesar de esto, algunos genotipos mostraron una respuesta diferente. En particular, las semillas de los biotipos Virasoro y Chirú, no mostraron incrementos en la germinación y hasta evidenciaron disminuciones, la ssp. *flavescens*, no mostró incrementos para las semillas cosechadas en otoño 2012 y algunos clones pentaploides presentaron respuestas germinativas ante la posmaduración distintas a la respuesta promedio (Tabla II.2). En otros trabajos, se ha reportado variación inter- e intra-específica en la respuesta al almacenamiento en seco entre semillas de especies silvestres de *Oryza* spp. sometidas a las mismas condiciones de almacenamiento (Veasey et al., 2004). Por tanto, el tiempo de almacenamiento requerido para disminuir el nivel de dormición debería ser ajustado para cada biotipo de *P. dilatatum*, e incluso para alguno de los clones pentaploides. Para el caso de *Paspalum* spp. se ha sugerido que el almacenamiento en seco podría actuar debilitando las cubiertas de las semillas (lema y pálea del antecio fértil), como se ha sugerido para *P. notatum* (West y Marousky, 1989). Estas estructuras han sido reportadas como las principales limitantes para la germinación de *Paspalum* spp. (Fulbright y Flenniken, 1988, Marousky y West, 1988, Kalmbacher et al., 1999). La incidencia de las cubiertas en la germinación de semillas de *P. dilatatum* será abordado más adelante en la presente tesis (ver Capítulo III).

Salvo en algunos genotipos, no hubo diferencias en la respuesta germinativa de semillas recién cosechadas entre los momentos de cosecha evaluados. En trabajos previos, se encontraron diferencias entre momentos de cosecha en *P. dilatatum* (Tischler y Burson, 1999) y en otras especies (Andersson y Milberg, 1998). Estos resultados fueron obtenidos con semillas cosechadas en condiciones de campo. En nuestro trabajo, las altas temperaturas promedio dentro del invernáculo durante el desarrollo de las semillas (24 y 28 °C para las cosechas de otoño y verano

respectivamente) pueden haber enmascarado posibles diferencias entre los momentos de cosecha. De todas formas, resultó interesante que los únicos genotipos afectados hayan sido clones pentaploides del grupo a (Tabla 1) y los biotipos Virasoro y Chirú, los cuales se han reportado que están relacionados genéticamente (Speranza, 2005b, 2009). Por otra parte, al comparar semillas con seis meses de almacenamiento, las respuestas germinativas de las semillas cosechadas en verano fueron mayores a las de otoño para todos los genotipos. La temperatura ha sido reportada como un factor significativo que afecta la tasa de posmaduración durante el almacenamiento (Meyer y Allen, 2009). La temperatura promedio para todo el período de almacenamiento resultó menor para las semillas cosechadas en otoño 2011 y otoño 2012 que la registrada para las semillas cosechadas en verano 2012. En consecuencia, mayores temperaturas en el almacenamiento en seco pueden ser más efectivas en la disminución de la dormición de semillas de *P. dilatatum*, tal como ha sido reportado para *P. atratum* (Kalmbacher et al., 1999) y para *Bromus tectorum* L. (Allen et al., 1995).

Se han registrado diferentes respuestas germinativas entre los biotipos sexuales Virasoro y ssp. *flavescens* ante las condiciones de incubación (32 °C constante) sin pre-imbibición (Figuras II.1, II.2 y II.3). Estos biotipos resultan de interés porque son considerados en investigaciones que promueven su adopción comercial en Uruguay y Argentina, debido a que presentan mayor producción de semillas y menor susceptibilidad a *Claviceps*, además de que se ha sugerido que están genéticamente relacionadas a determinados clones pentaploides recombinantes (Speranza, 2005b). En la región, estos biotipos se encuentran restringidos a áreas geográficamente distantes y genéticamente aislados (Speranza, 2009), aunque pueden ser artificialmente cruzados para producir híbridos fértiles (Caponio y Quarin, 1990). Se han reportado diferencias en la temperatura óptima de germinación entre especies de gramíneas estivales perennes (Hsu et al., 1985, Roundy y Biedenbender, 1996), y también entre variedades de *Panicum virgatum* L. (Seepaul et al., 2011). Una posible hipótesis para explicar los resultados obtenidos y la restricción geográfica podría ser que Virasoro y ssp. *flavescens* presentan temperaturas óptimas de germinación

diferentes. Por tanto, futuros trabajos sobre las características de la germinación de estos biotipos pueden proveer información de interés para la domesticación y el mejoramiento de la especie.

El biotipo monoclonal Chirú, el cual se ha sugerido que está relacionado genéticamente con Virasoro (Speranza, 2009), mostró un comportamiento germinativo más extremo porque no hubo diferencias entre los tratamientos de pre-imbibición en ningún caso. Este genotipo, el cual ha sido liberado como cultivar en Uruguay, puede requerir sólo altas temperaturas para germinar sin necesitar temperaturas más frescas. Por otra parte, ha mostrado una respuesta germinativa decreciente ante tiempos mayores de almacenamiento (Tabla II.2), sugiriendo que pudo haberse inducido una dormición secundaria bajo estas condiciones (Batlla y Benech-Arnold, 2010). El biotipo Uruguaiana, también hexaploide, mostró un comportamiento germinativo totalmente contrario al Chirú porque fue de los biotipos con menores proporciones de semillas germinadas, aún con el tratamiento de pre-imbibición a 20 °C. Por último, se registraron algunas diferencias menores entre clones pentaploides, que no se corresponden con el grupo genético, registrando diferencias dentro de los mismos. Pueden ser necesarios futuros trabajos en otras condiciones de germinación para evaluar si estas diferencias tienen relevancia biológica y/o agronómica.

II.G. CONCLUSIONES

Se registró variabilidad en la respuesta germinativa ante los tratamientos de pre-imbibición y hubo interacción con el tiempo de almacenamiento. Estas diferencias fueron similares entre los distintos momentos de cosecha. Los clones pentaploides, la *ssp. flavescens* y el biotipo Uruguaiana requirieron pre-imbibición para terminar con la dormición, obteniendo los mejores resultados a 20 °C, mientras que los biotipos Chirú y Virasoro registraron mayor germinación que los restantes genotipos en temperaturas altas y constantes, siendo Chirú el que mostró un comportamiento germinativo más extremo, mostrando muy altos porcentajes de germinación aún con semillas recién cosechadas. El almacenamiento en seco generó posmaduración en la

mayoría de los genotipos de *P. dilatatum* evaluados, pero mostrando diferentes tasas dependiendo del genotipo y del ambiente de almacenamiento. Se requerirán futuros trabajos para determinar si la variabilidad que encontramos en estos ensayos puede ser debida a diferencias en la temperatura óptima de germinación entre los genotipos, particularmente para los biotipos Virasoro y Chirú. Por último, la existencia de variabilidad en el comportamiento germinativo de las semillas de esta especie haría posible la selección de genotipos más apropiados para su adopción.

II.H. BIBLIOGRAFÍA

- Adkins SW, Bellairs SM, Loch DS.** 2002. Seed dormancy mechanisms in warm season grass species. *Euphytica*, 126(1): 13–20.
- Allen PS, Meyer SE, Beckstead J.** 1995. Patterns of seed after-ripening in *Bromus tectorum* L. *Journal of Experimental Botany*, 46(292): 1737–1744.
- Andersson L, Milberg P.** 1998. Variation in seed dormancy among mother plants, populations and years of seed collection. *Seed Science Research*, 8(1): 29–38.
- Baskin CC, Baskin JM.** 2000. Seeds: ecology, biogeography, and evolution of dormancy and germination. San Diego: Elsevier. 666 p.
- Batlla D, Benech-Arnold RL.** 2010. Predicting changes in dormancy level in natural seed soil banks. *Plant Molecular Biology*, 73(1-2): 3–13.
- Beckman JJ, Moser LE, Kubik K, Waller SS.** 1993. Big bluestem and switchgrass establishment as influenced by seed priming. *Agronomy Journal*, 85(2): 199–202.
- Benech-Arnold RL, Sánchez RA, Forcella F, Kruk BC, Ghera CM.** 2000. Environmental control of dormancy in weed seed banks in soil. *Field Crops Research*, 67(2): 105–122.
- Burson BL.** 1991. Homology of chromosomes of the X genomes in common and Uruguayan dallisgrass, *Paspalum dilatatum*. *Genome*, 34(6): 950–953.

- Campbell BD, Mitchell ND, Field TR.** 1999. Climate profiles of temperate C3 and subtropical C4 species in New Zealand pastures. *New Zealand Journal of Agricultural Research*, 42(3): 223–233.
- Caponio I, Quarin C.** 1990. Intra- and interspecific hybridization between dallisgrass and vaseygrass. *Crop Science*, 30(2): 362–364.
- Cornaglia PS, Schrauf GE, Deregibus VA.** 2009. Flooding and grazing promote germination and seedling establishment in the perennial grass *Paspalum dilatatum*. *Austral Ecology*, 34(3): 343–350.
- Fenner M.** 1991. The effects of the parent environment on seed germinability. *Seed Science Research*, 1(2): 75–84.
- Foley ME.** 2001. Seed dormancy: An update on terminology, physiological genetics, and quantitative trait loci regulating germinability. *Weed Science*, 49(3): 305–317.
- Fulbright T, Flenniken K.** 1988. Causes of dormancy in *Paspalum plicatulum* (Poaceae) seeds. *The Southwestern Naturalist*, 33(1): 35–39.
- García MV, Balatti PA, Arturi MJ.** 2007. Genetic variability in natural populations of *Paspalum dilatatum* Poir. analyzed by means of morphological traits and molecular markers. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 54(5): 935–946.
- Gepts P.** 2004. Crop domestication as a long-term selection experiment. En: Janick J. (Ed.). *Plant breeding reviews: Long-term selection: Crops, animals, and bacteria*, volume 24, part 2. Oxford: Wiley & Sons. 1–44.
- Glison N, Viega L, Speranza P.** 2011. Preliminary study of the effect of the post-harvest period and the chilling treatment on the germination of *Paspalum dilatatum* ssp. *flavescens* seeds and other biotypes. *Análisis de Semillas*, Volumen 5, Número 17: 71–75.

- Hickenbick M.** 1992. Mode of reproduction and seed production in *Paspalum dilatatum* Poir. Virasoro biotype – Dilatata group (Gramineae). *Revista Brasileira de Genética*, 15(1): 85–102.
- Hsu F, Nelson C, Matches A.** 1985. Temperature effects on germination of perennial warm-season forage grasses. *Crop Science*, 25(2): 215–220.
- ISTA, International Seed Testing Association.** 1999. International rules for seed testing. *Seed Science and Technology*, 27(Supplement). 333 p.
- Johnston M, Miller J.** 1964. Investigations into techniques for the germination of *Paspalum dilatatum*. *Proceeding of the International Seed Test Association*, 29(1): 145–148.
- Kalmbacher RS, West S, Martin FG.** 1999. Seed dormancy and aging in Atrá Paspalum. *Crop Science*, 39(6): 1847–1852.
- Kermode AR.** 2005. Role of abscisic acid in seed dormancy. *Journal of Plant Growth Regulation*, 24(4): 319–344.
- Loreti J, Oosterheld M.** 1996. Intraspecific variation in the resistance to flooding and drought in populations of *Paspalum dilatatum* from different topographic positions. *Oecologia*, 108(2): 279–284.
- Machado A, Valls J, Peñaloza A, Santos S.** 2005. New pentaploid biotypes of the Dilatata group of *Paspalum* L. (Gramineae) from Southern Brazil. *Ciência Rural*, 35(1): 56–61.
- Maeda J, Pereira M, Medina P.** 1997. Seed dormancy and storage of *Paspalum notatum* Flügge. *Revista Brasileira de Sementes*, 19(2): 164–170.
- Marousky F, West S.** 1988. Germination of bahiagrass in response to temperature and scarification. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 113(6): 845–849.

- Meyer SE, Allen PS.** 2009. Predicting seed dormancy loss and germination timing for *Bromus tectorum* in a semi-arid environment using hydrothermal time models. *Seed Science Research*, 19(4): 225–239.
- Pearson C, Shah S.** 1981. Effects of temperature on seed production, seed quality and growth of *Paspalum dilatatum*. *Journal of Applied Ecology*, 18(3): 897–905.
- Pizarro E.** 2000. Potencial forrajero del género *Paspalum*. *Pasturas Tropicales*, 22(1): 38–46.
- Roundy B, Biedenbender S.** 1996. Germination of warm-season grasses under constant and dynamic temperatures. *Journal of Range Management*, 49(5): 425–431.
- Schrauf GE, Cornaglia PS, Deregibus VA, Ríssola MG.** 1995. Improvement in germination behaviour of *Paspalum dilatatum* Poir. seeds under different pre-conditioning treatments. *New Zealand Journal of Agricultural Research*, 38(4): 501–509.
- Seepaul R, Macoon B, Reddy KR, Baldwin B.** 2011. Switchgrass (*Panicum virgatum* L.) intraspecific variation and thermotolerance classification using *in vitro* seed germination assay. *American Journal of Plant Sciences*, 2(2): 134–147.
- Souza-Chies T, Cavalli-Molina S.** 1995. Variability in seed production and germination in *Paspalum* – Dilatata group (Gramineae). *Revista Brasileira de Biologia*, 55(1): 127–139.
- Speranza PR.** 2009. Evolutionary patterns in the Dilatata group (*Paspalum*, Poaceae). *Plant Systematics and Evolution*, 282(1-2): 43–56.

- Speranza PR.** 2005a. The challenges of the exploration of genetic resources in apomictic plants: Lessons from *Paspalum dilatatum*. *Agrociencia*, 9(1-2): 73–76.
- Speranza PR.** 2005b. Evolutionary patterns in the Dilatata group (*Paspalum*, Poaceae): A polyploid / agamic complex. [Tesis de doctorado]. Gainesville, Florida: University of Florida. 106 p.
- Tischler C, Burson BL.** 1999. Seed dormancy and germination of dallisgrass, *Paspalum dilatatum*, stored under differing conditions. *Seed Science and Technology*, 27(1): 263–271.
- Veasey EA, Karasawa MG, Santos PP, Rosa MS, Mamani E, Oliveira GC.** 2004. Variation in the loss of seed dormancy during after-ripening of wild and cultivated rice species. *Annals of Botany*, 94(6): 875–882.
- Venuto BC, Burson BL, Hussey MA, Redfearn DD, Wyatt WE, Brown LP.** 2003. Forage yield, nutritive value, and grazing tolerance of dallisgrass biotypes. *Crop Science*, 43(1): 295–301.
- West S, Marousky F.** 1989. Mechanism of dormancy in Pensacola bahiagrass. *Crop Science*, 29(3): 787–791.
- Zarnstroff ME, Keys RR, Chamblee DS.** 1994. Growth regulator and seed storage effects on switchgrass germination. *Agronomy Journal*, 86(4): 667–672.

III. DIFERENCIAS EN LA INCIDENCIA DE LA LEMA SOBRE LA DORMICIÓN DE SEMILLAS ENTRE GENOTIPOS DE *PASPALUM DILATATUM* POIR.^b

Glison, Nicolás¹, Viega, Luis¹ y Speranza, Pablo²

1: Laboratorio de Fisiología Vegetal, Departamento de Biología Vegetal, Facultad de Agronomía, Universidad de la República, Montevideo, Uruguay. Código postal: 12900.

2: Laboratorio de Evolución y Domesticación de las Plantas, Departamento de Biología Vegetal, Facultad de Agronomía, Universidad de la República, Montevideo, Uruguay. Código postal: 12900.

Correo electrónico del primer autor: nigli@fagro.edu.uy

III.A. RESUMEN

Conocer los mecanismos de la dormición de semillas puede contribuir al proceso de domesticación de una especie. *Paspalum dilatatum* es una gramínea estival promisorio como forraje, pero sus semillas presentan baja germinación que limita su adopción. Las cubiertas (lema y pálea) tienen incidencia sobre la germinación, pero no se conoce el mecanismo involucrado, o si las cubiertas tienen efecto sobre el nivel de dormición, el cual puede inferirse por la sensibilidad al ácido abscísico (ABA). En el presente trabajo, semillas de diferentes genotipos de *P. dilatatum* fueron sometidas a escarificación ácida y extracción de la lema para estudiar la respuesta germinativa, la imbibición y la sensibilidad al ABA, considerando dos tiempos de almacenamiento (uno y cinco meses) como factor que modifica el nivel de dormición. Semillas sin lema obtuvieron mayor germinación que semillas enteras o con escarificación ácida, excepto en el biotipo Chirú que no mostró diferencias entre

^b El formato de las citas y referencias bibliográficas del presente capítulo se adecua a lo requerido en la revista Agrocencia.

tratamientos. Además, el tiempo de almacenamiento incrementó la germinación tanto en semillas sin lema como enteras, manteniendo la diferencia entre tratamientos. Por otra parte, la imbibición no resultó limitante para la germinación de ningún genotipo o tratamiento. Por último, hubo inhibición de la germinación con 10 μM de ABA, pero sólo para semillas con un mes de almacenadas, no registrándose respuesta en semillas con cinco meses. Se sugiere que la lema ejerce una resistencia mecánica a la germinación, pero no afectaría el nivel de dormición, y se propone que la dormición se explicaría por una interacción entre las cubiertas y el cariopse.

Palabras clave: biotipos de *P. dilatatum*, germinación de semillas, nivel de dormición, posmaduración, sensibilidad al ABA

Differences in the incidence of the lemma on seed dormancy among genotypes of *Paspalum dilatatum* Poir.

III.B. SUMMARY

Knowledge of seed dormancy mechanisms can make a contribution to the domestication process. *Paspalum dilatatum* is an promising summer grass as forage, but has low seed germination which hinders its adoption. Seed coats (lemma and palea) have an influence on germination, but the mechanism involved has not been elucidated. It is not known whether the coats have an effect on seed dormancy level, which may be inferred by their sensitivity to Abscisic Acid (ABA). In this paper, different genotypes of *P. dilatatum* seeds were subjected to acid scarification and lemma removal to study the germination, imbibition and sensitivity to ABA, considering two dry storage times (one and five months) as a factor that affects dormancy level. Seeds without lemma showed higher germination percentages than after acid scarification or untreated seeds, except for the Chirú biotype which showed no differences among treatments. Besides, the dry storage time increased germination in untreated and seeds without lemma similarly, maintaining the differences between treatments. Otherwise, seed imbibition was not limiting for germination to any genotype or treatment. Finally, there was inhibition of

germination in seeds after one month of storage with 10 μM ABA, but no response was observed after five months of storage. It is suggested that the lemma exert mechanical resistance to germination, but not affect the dormancy level. It is proposed that dormancy could be explained by an interaction between seed coats and the caryopsis.

Keywords: *P. dilatatum* biotypes, seed germination, dormancy level, after-ripening, ABA sensitivity

III.C. INTRODUCCIÓN

Las especies silvestres frecuentemente presentan mayor dormición de semillas que las especies domesticadas (Gepts, 2004). La mayoría de las gramíneas estivales con valor forrajero presentan semillas con niveles de dormición similares a sus formas salvajes (Adkins et al., 2002), característica poco favorable para lograr un establecimiento uniforme de una pastura. *Paspalum dilatatum* Poir. ha sido propuesta como pastura estival perenne para zonas templadas debido a su buen crecimiento a temperaturas cálidas (Pearson y Shah, 1981) y su tolerancia a heladas, sequías y anegamientos (Loreti y Oosterheld, 1996, Campbell et al., 1999). Una de las principales limitantes para su adopción se basa en que sus semillas presentan dormición (Schrauf et al., 1995). Conocer los posibles mecanismos de dormición y los factores que la afectan permitiría avanzar hacia un establecimiento exitoso del futuro cultivo.

La unidad de dispersión de las paníceas, comercialmente denominadas semillas, son las espiguillas completas que contienen al cariopse fuertemente encerrado por lema y pálea rígidas, Lema II y Pálea II (Loch et al., 2004). Tratamientos de escarificación ácida o mecánica y la extracción de estas cubiertas (lema y pálea) resultaron en incrementos de la germinación en diversas especies de paníceas, atribuyéndole a las mismas un rol muy importante en la dormición (Whiteman y Mendra, 1982, Hacker, 1984, Huang y Hsiao, 1987, Dekker et al., 1996, Gallart et al., 2008). Para semillas de paníceas, se han propuesto posibles mecanismos de la dormición impuesta por cubiertas: i) impermeabilidad o restricción a la absorción de agua (West y Marousky,

1989, Khan et al., 1997), ii) presencia de inhibidores de la germinación (Tischler y Young, 1983, Marousky y West, 1988), y iii) resistencia mecánica ante el crecimiento del embrión (Fulbright y Flenniken, 1988).

El nivel de dormición de semillas de *P. dilatatum* puede ser diferente según genotipos y fechas de cosecha (Tischler y Burson, 1999, ver Capítulo II). A su vez, se ha reportado que el almacenamiento en seco disminuye el nivel de dormición de semillas de *Paspalum* spp. (Maeda et al., 1997, ver Capítulo II), proceso conocido como posmaduración (Foley, 2001). Sin embargo, no existen evidencias en *Paspalum* spp. que muestren como interactúan las cubiertas con estos factores que modifican el nivel de dormición. Aunque no hay un método de medir directamente el nivel de dormición, la sensibilidad de las semillas al ácido abscísico (ABA) ha sido propuesta como una aproximación adecuada para varias especies (Hilhorst, 1995, Finch-Savage y Leubner-Metzger, 2006). Semillas con menor nivel de dormición, ya sea por almacenamiento en seco o tratamientos de estratificación, mostraron menor inhibición de la germinación a concentraciones crecientes de ABA exógeno (Gianinetti y Vernieri, 2007, Goggin et al., 2009). Existen estudios del efecto inhibitorio sobre la germinación del ABA exógeno en semillas de paníceas, como *Panicum virgatum* L. (Sarath et al., 2006, 2007), pero no hay evidencias con semillas cuyas cubiertas hayan sido extraídas. En este trabajo, se propone estudiar el mecanismo de dormición impuesto por cubiertas para semillas de *P. dilatatum* y si existen diferencias entre genotipos en las mismas. Para ello, se realizaron ensayos de germinación y de imbibición a semillas con tratamientos que afectaron la integridad de las cubiertas. Para considerar diferentes niveles de dormición de las semillas, se evaluaron dos tiempos de almacenamiento en seco y dos momentos de cosecha. Además, se evaluó la germinación de dos biotipos contrastantes ante concentraciones crecientes de ABA, tanto de semillas enteras como de semillas sin lema, para comprobar el rol de las cubiertas en la respuesta a esta hormona.

III.D. MATERIALES Y MÉTODOS

III.D.1. Material vegetal y cosecha de semillas

Se seleccionaron siete genotipos de *Paspalum dilatatum*, obtenidos de la colección de semillas del Banco de Germoplasma de Facultad de Agronomía, (Universidad de la República, Uruguay). Los genotipos fueron cuatro clones pentaploides apomícticos (a62-8, b67, c33-1 y d58-2), un hexaploide apomíctico (biotipo Chirú) y una línea pura de dos tetraploides sexuales (biotipo Virasoro y ssp. *flavescens*). Los mismos representan gran parte de la variabilidad genética para la especie reportada por Speranza (2005, 2009). Cinco plantas individuales por cada genotipo fueron cultivadas en macetas (22 cm diámetro, 19 cm de profundidad) dentro de un invernáculo en Facultad de Agronomía (Montevideo, Uruguay) durante tres años (2009 a 2012). Las semillas se cosecharon en enero de 2012 (verano 2012) y abril de 2012 (otoño 2012), se limpiaron con una sopladora y se seleccionaron a mano para descartar espiguillas vacías o con esclerocios de *Claviceps*, para luego almacenarlas en sobres de papel dentro de una cámara cerrada sin control de temperatura. Para los lotes de verano 2012 se muestrearon semillas a uno y cinco meses de almacenadas, mientras que para el lote de otoño 2012 se realizó un único muestreo con un mes de almacenamiento.

III.D.2. Ensayos de germinación con semillas escarificadas y sin lema

Se utilizaron los siete genotipos sometiendo a las semillas a tres tratamientos: i) semillas sin tratamiento (semillas enteras), ii) semillas sumergidas en H_2SO_4 (cc) por dos minutos con agitación, lavándolas luego con agua corriente (semillas escarificadas), y iii) semillas con lema extraída manualmente, dejando el cariopse descubierto y la pálea (semillas sin lema). Se utilizaron 30 semillas por cada réplica, con tres réplicas por cada tratamiento. Luego de realizados los tratamientos, las semillas fueron colocadas sobre toallas de papel en placas de Petri de 10 cm. El papel fue humedecido con solución de KNO_3 0,02 M (0,2% m/v) al inicio y se regó con agua destilada para reponer el agua durante el transcurso del ensayo. Todas las réplicas fueron colocadas dentro de una cámara de incubación con luz fluorescente

(15 – 20 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$) a 32 °C constante durante 14 días, de acuerdo a lo realizado por Maeda et al. (1997). Bajo estas condiciones se ha mostrado variabilidad en la germinación según genotipo y factores ambientales que afectan la germinabilidad (ver Capítulo II). Para cada réplica, se registró el porcentaje de germinación final. Se consideró germinada una semilla cuando exhibió como mínimo la radícula o el coleoptile de 2 mm. Luego de finalizado el período de incubación, las semillas no germinadas se sometieron al test de tetrazolio para evaluar viabilidad, de acuerdo con Maeda et al. (1997), y el porcentaje de viabilidad se calculó como la suma del porcentaje de germinación más el porcentaje de semillas viables no germinadas. Para este experimento, el diseño fue de parcelas divididas con análisis factorial, donde el tiempo de almacenamiento y los tratamientos sobre las semillas y su interacción fueron los tratamientos principales. Los genotipos y su interacción con los tratamientos principales fueron las sub-parcelas. Se sustituyó en el modelo el tiempo de almacenamiento por la fecha de cosecha cuando se comparó el lote de verano con el de otoño con un mes de almacenadas. Se utilizó el procedimiento GENMOD (SAS 9.2, *SAS Inst.*), con la proporción de semillas germinadas como variable de respuesta, estimando los límites de confianza al 95% para cada tratamiento.

III.D.3. Ensayos de imbibición con semillas escarificadas y sin lema.

Se utilizaron semillas cosechadas en verano 2012 de tres genotipos con comportamientos germinativos contrastantes (ver Capítulo II): biotipo Virasoro, ssp. *flavescens* y un clon pentaploide (d58-2); con uno y cinco meses de almacenamiento. En cada caso se sometieron las semillas a los tres tratamientos anteriormente mencionados. Se utilizaron 30 semillas por cada réplica, con tres réplicas por cada tratamiento. Se determinó el peso fresco inicial de cada réplica y luego se colocó a las semillas sobre capas de papel humedecido con agua destilada dentro de placas de Petri de 10 cm. Las semillas fueron retiradas de la imbibición a los 10 min, 30 min, 60 min (1 h), 120 min (2 h), 240 min (4 h), 1440 min (24 h) y 2880 min (48 h), pesadas (previo enjugado del agua superficial con papel absorbente) y vueltas a embeber. Se calculó para cada réplica el incremento en el peso relativo (IPR), según:

$$(1) \quad \text{IPR}_t = (P_t - P_i) / P_i$$

donde P_t es el peso al tiempo t de imbibición y P_i el peso inicial. Para este experimento, se utilizó un diseño de bloques aleatorizados con medidas repetidas en el tiempo con análisis factorial. Los datos fueron analizados por el procedimiento MIXED (SAS 9.2, *SAS Inst.*), con el porcentaje de IPR como variable de respuesta:

$$(2) \quad \% \text{ IPR} = 100 * \text{IPR}_t / \text{IPR}_f$$

donde IPR_f es el incremento del peso relativo promedio a las 24 h de imbibición. Se estimó para cada caso el desvío estándar.

III.D.4. Ensayos de sensibilidad al ABA exógeno

Semillas enteras y sin lema del biotipo Virasoro y la ssp. *flavescens* del lote de verano 2012, con uno y cinco meses de almacenamiento, fueron colocadas en placas de Petri previamente preparadas con un medio agar-agua que contenía concentraciones progresivas de ABA. El medio fue preparado con un sustrato agar-agua al 0,8 %, con 0,02 M de KNO_3 , sobre placa calentadora para facilitar su disolución. A partir de un stock de 100 μM de ABA (Sigma) con 0,1 % de DMSO, de acuerdo a Goggin et al. (2009), se preparó el medio con cuatro concentraciones de ABA diferentes (0; 0,1; 1,0 y 10 μM). La solución de ABA se agregó cuando el sustrato agar-agua presentó temperaturas menores a 45°C. Los medios con las distintas concentraciones de ABA fueron colocados en placas de Petri de vidrio de 12 cm y se los mantuvo en frío (5 °C), hasta el momento de iniciar el experimento. En cada placa se colocaron 20 semillas enteras y 20 semillas sin lema, completando tres réplicas para cada tratamiento. Las placas de Petri con las semillas embebidas fueron colocadas en una cámara con temperatura controlada a 20 °C en oscuridad durante 7 días, para luego ser transferidas a la cámara de incubación con luz y temperatura de 32 °C constante. Esta pre-imbibición logra promover la germinación en esta especie (ver Capítulo II). Las semillas germinadas fueron contabilizadas todos los días, a partir de lo cual se computaron el porcentaje de germinación una vez finalizada la pre-imbibición a 20 °C (% G_0), el porcentaje de germinación luego de 14 días de

incubación a 32 °C (% G₁₄) y el tiempo en días en alcanzar el 50 % de la germinación final (t_{50%}). Para este experimento, el diseño fue de parcelas subdivididas, donde el almacenamiento y la concentración de ABA fueron los tratamientos principales, los genotipos fueron las parcelas menores. Cada réplica presentó dos sub-parcelas compuestas por semillas enteras y semillas sin lema. Los datos relativos a porcentaje de germinación se analizaron con el procedimiento GENMOD, mientras que t_{50%} se analizó con el procedimiento MIXED (SAS 9.2, *SAS Inst.*).

III.D.5. Características físicas de las lemas

Se determinó el espesor y el peso de las lemas del biotipo Virasoro y de la ssp. *flavescens*, que fueron colectadas de todos los experimentos. Para la determinación del espesor, se colocaron dieciocho lemas (tres réplicas de seis) de cada genotipo sobre un portaobjeto y debajo de un cubreobjeto, ambos marcados con líneas de tinta indeleble. El espesor de cada lema individual fue medido mediante el uso de un micrómetro calibrado de un microscopio óptico. Para determinar el peso de las lemas se tomaron tres réplicas de 20 lemas de cada biotipo y se pesó cada réplica en una balanza analítica con resolución de 0,1 mg (AA-250, *Denver Instruments Company*).

III.E. RESULTADOS

III.E.1. Ensayos de germinación

Hubo efecto de los tratamientos sobre las semillas y los genotipos presentaron diferencias en su respuesta germinativa a los mismos ($p < 0,05$). Las semillas sin lema presentaron mayor germinación que semillas enteras para los clones pentaploides, ssp. *flavescens* y biotipo Virasoro (60 y 3 % en promedio, respectivamente) en semillas con un mes de almacenadas. No hubo diferencias entre semillas enteras y escarificadas, excepto para a62-8 y b67 (Figura III.1 A). Por otro lado, existió un incremento en la germinación para todos los tratamientos en las semillas de clones pentaploides con 5 meses de almacenadas, excepto para semillas enteras de a62-8. La interacción entre el tiempo de almacenamiento y el genotipo resultó significativa ($p < 0,05$). El tiempo de almacenamiento no afectó la respuesta

germinativa de la *ssp. flavescens* ni del biotipo Virasoro (Figura III.1 B). No existieron diferencias entre fechas de cosecha dentro de cada genotipo, ya que los comportamientos de semillas cosechadas en otoño fueron similares para todos los tratamientos a los obtenidos con semillas cosechadas en verano, cuando ambas presentaban un mes de almacenamiento (Figura III.1 A y C). El biotipo Chirú (Ch-4)

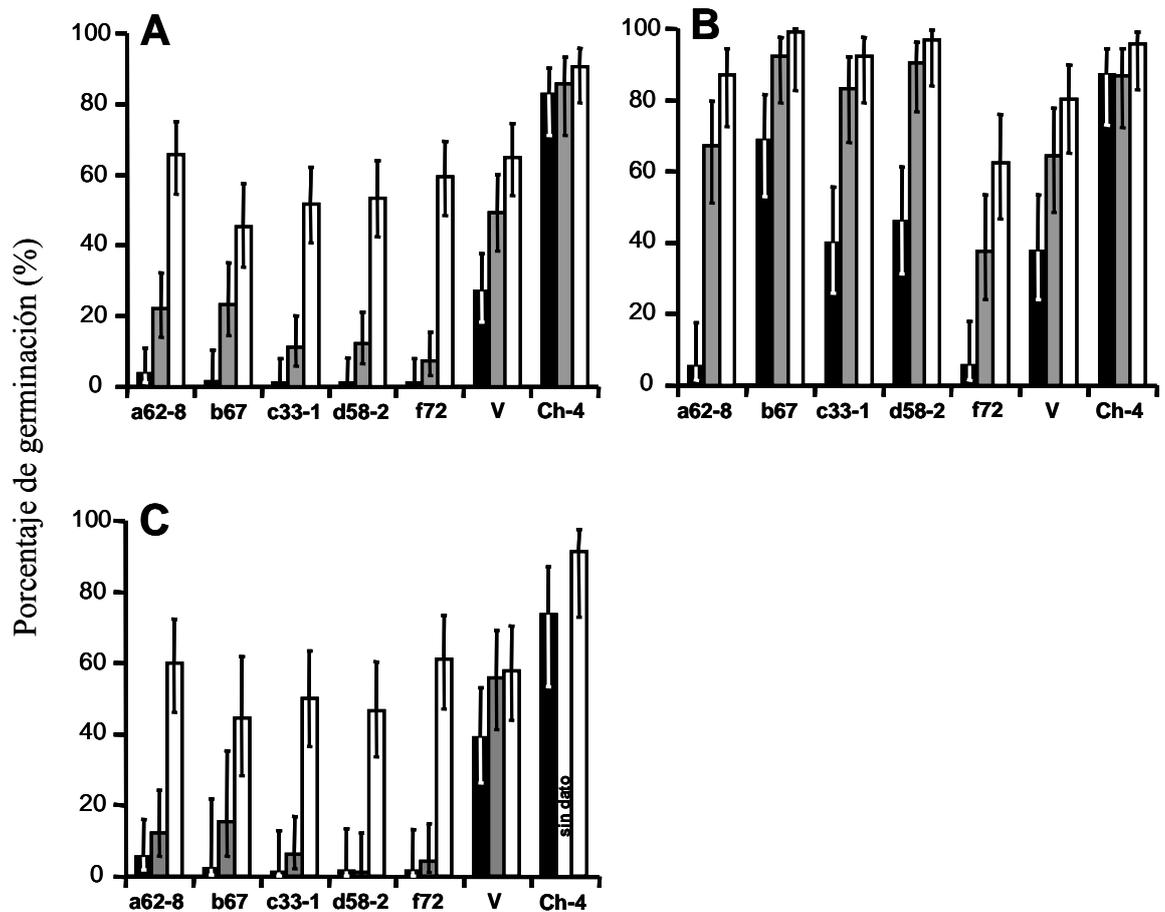


Figura III.1: Porcentaje de germinación luego de 14 días a 32°C para semillas de diferentes genotipos de *P. dilatatum*: clones pentaploides (a62-8, b67, c33-1 y d58-2), *ssp. flavescens* (f72), biotipo Virasoro (V) y biotipo Chirú (Ch-4). Barras negras: semillas enteras; barras grises: semillas escarificadas; barras blancas: semillas sin lema. A: semillas cosechadas en verano 2012 con 1 mes de almacenamiento; B: semillas cosechadas en verano 2012 con 5 meses de almacenamiento y C: semillas cosechadas en otoño 2012 con 1 mes de almacenamiento. Líneas verticales representan los límites de confianza al 95%.

no mostró diferencias significativas entre tratamientos, ni tiempos de almacenamiento (Figura III.1 A y B), alcanzando en todos los casos porcentajes de germinación superiores al 80 %. La viabilidad promedio resultó alta (mayor o igual al 80 %), considerando todos los tratamientos y genotipos.

III.E.2. Ensayos de imbibición

Se registró un efecto del tiempo de imbibición sobre el incremento en el peso relativo para todos los tratamientos y genotipos ($p < 0,05$). Las semillas enteras o escarificadas presentaron un incremento significativo del peso de las semillas al ponerlas en imbibición (Figura III.2), alcanzando su máximo peso a las 24 h, manteniéndose constante a las 48 h (dato no mostrado). Mientras tanto, las semillas sin lema mostraron su máximo peso a los 120 minutos (2 h), alcanzándolo antes que las semillas con el antecio fértil íntegro (semillas enteras y escarificadas). No existieron diferencias en %IPR entre genotipos ni tiempos de almacenamiento para ninguno de los tratamientos ($p < 0,05$).

III.E.3. Ensayos de sensibilidad al ABA exógeno

Las semillas sin lema de Virasoro y ssp. *flavescens* germinaron luego de someterlas a 20 °C y en oscuridad durante 7 días, condiciones que no lograron promover la germinación en semillas enteras (Tabla III.1, % G_0). Las semillas sin lema germinadas en estas condiciones presentaron largos coleoptiles etiolados. Sin embargo, a excepción de semillas de ssp. *flavescens* con un mes de almacenadas, no hubo diferencias entre semillas enteras y sin lema al comparar la germinación final (Tabla III.1, % G_{14}), pero las semillas sin lema alcanzaron el 50 % de la germinación final antes que las semillas enteras en casi todos los casos (Tabla III.1, $t_{50\%}$). El ABA exógeno (10 μ M) inhibió la germinación tanto para semillas enteras como sin lema con un mes de almacenamiento. Sin embargo, no hubo efecto de la hormona para semillas con cinco meses de almacenamiento con las concentraciones ensayadas, cualquiera sea el genotipo o el tratamiento evaluado (Tabla III.1).

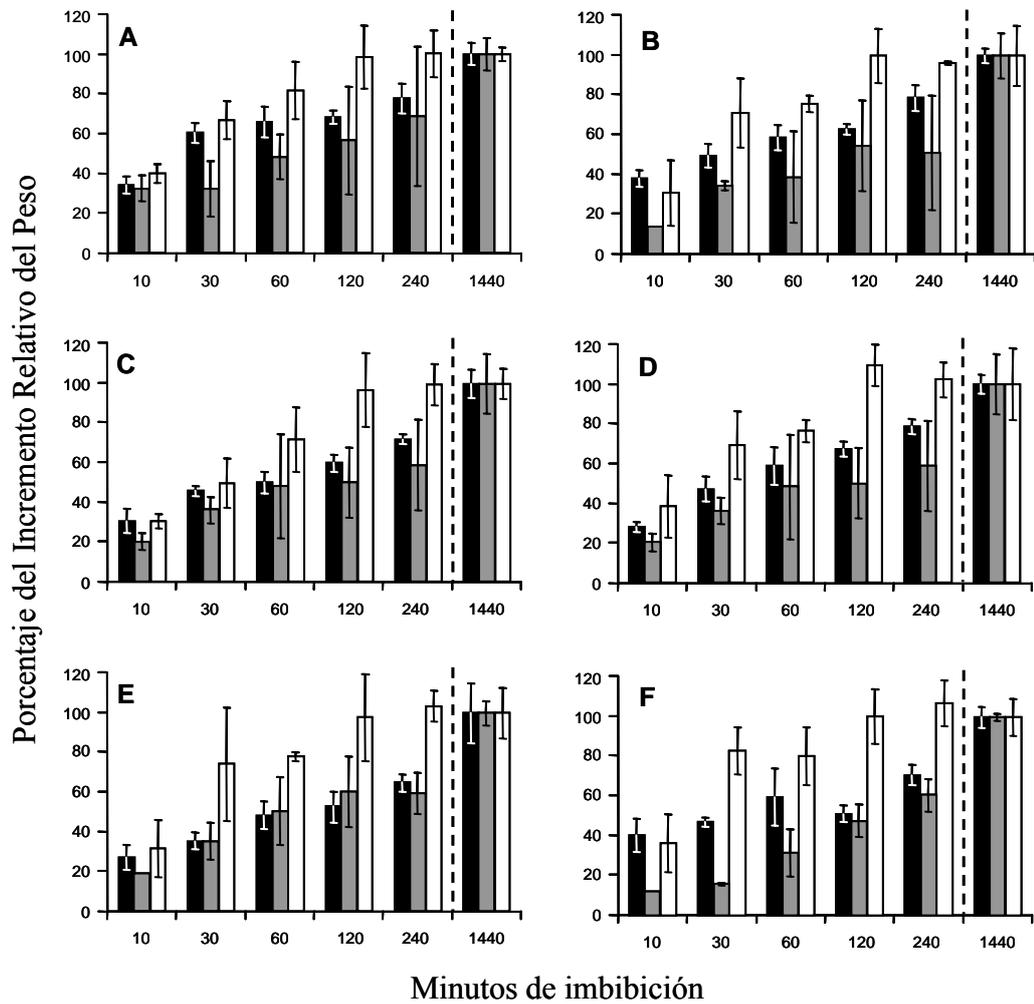


Figura III.2: Porcentaje del incremento relativo del peso de 30 semillas con 10 min, 30 min, 60 min (1 hr.), 120 min (2 hs.), 240 min (4 hs.) y 1440 min (24 hs.) minutos de imbibición, con respecto al promedio obtenido a las 24 hs. Barras negras: semillas enteras; barras grises: semillas escarificadas; barras blancas: semillas sin lema. Líneas verticales representan el desvío estandar. A y B: biotipo Virasoro; C y D: *ssp. flavescens*; E y F: clon pentaploide d58-2. A, C y E: semillas con 1 mes de almacenadas; B, D y F: semillas con 5 meses de almacenadas.

Tabla III.1: Sensibilidad al ABA de semillas enteras (E) y sin lemas (P) del biotipo Virasoro y la ssp. *flavescens* con dos tiempos de almacenamiento (1 y 5 meses). Se muestran el porcentaje de germinación luego de 7 días a 20°C en oscuridad previo a condiciones de incubación (% G₀), el porcentaje de germinación luego de 14 días de incubación a 32°C y luz cte. (% G₁₄), y el tiempo en días al 50% de germinación total (t_{50%}).

Tiempo de almacenamiento	Genotipo	[ABA] (μM)	% G ₀		% G ₁₄		t _{50%} (d)		
			E	P	E	P	E	P	
1 mes	<i>ssp.</i> <i>flavescens</i>	0	0	30 *	38	100 *	2,7	1,3 *	
		0,1	0	30 *	36	97 *	3,5	1,0 *	
		1	0	30 *	45	97 *	3,7	1,3 *	
		10	0	3	34	57 *	9,5	3,0 *	
	biotipo Virasoro	0	0	58 *	82	93	2,1	0 [#]	
		0,1	0	53 *	83	85	1,7	0 *	
		1	0	77 *	89	97	1,8	0 *	
		10	0	5	53	50	4,3	2,6 *	
	5 meses	<i>ssp.</i> <i>flavescens</i>	0	0	5	92	100	3,2	1,3 *
			0,1	0	8 *	82	100	2,5	2,4
1			2	38 *	90	95	2,5	0,5 *	
10			0	22 *	100	93	2,5	1,2 *	
biotipo Virasoro		0	0	48 *	97	97	1,7	0,3 *	
		0,1	0	48 *	98	93	2,5	0,3 *	
		1	0	58 *	98	95	2,5	0 *	
		10	0	58 *	93	98	2,5	0 *	

#: el valor 0 refiere a que se alcanzó o superó el 50% de la germinación total durante la pre-imbibición a 20 °C.

*: existió diferencias entre semillas enteras y sin lema dentro de la triple interacción ABA*genotipo*almacenamiento (p < 0,05).

Valores resaltados en negritas resultaron diferentes a los obtenidos con las restantes concentraciones de ABA dentro de la triple interacción semilla*genotipo*almacenamiento (p < 0,05).

III.E.4. Características físicas de las lemas

No hubo diferencias en el espesor promedio de las lemas analizadas entre el biotipo Virasoro y *ssp. flavescens* ($p < 0,05$), resultando 279 y 264 μm respectivamente, mientras que la variabilidad de la medida resultó muy importante para ambos biotipos (C.V. = 28 % para ambos biotipos). En cambio, el peso de 20 lemas resultó significativamente diferente ($p < 0,05$), siendo más pesadas las lemas de semillas de *ssp. flavescens* cosechadas en verano (3,1 mg) que las del mismo biotipo en la cosecha de otoño y que las lemas del biotipo Virasoro de cualquier cosecha (2,5 mg en promedio) (Tabla III.2).

Tabla III.2: Características de las lemas extraídas de semillas del biotipo Virasoro y la *ssp. flavescens*, con dos tiempos de almacenamiento (1 y 5 meses), y en dos fechas de cosecha. El espesor (μm) corresponde a una lema individual, mientras que el peso (mg) corresponde a 20 lemas.

Tiempo de almacenamiento	Genotipo	Espesor lema (μm)		Peso 20 lemas (mg)	
		Cosecha verano	Cosecha otoño	Cosecha verano	Cosecha otoño
1 mes	<i>ssp. flavescens</i>	319 a , A	219 a	3,2 a , A	2,4 b
	biotipo Virasoro	269 a , A	231 a	2,5 b , B	2,2 b
5 meses	<i>ssp. flavescens</i>	253 A	---	3,0 A	---
	biotipo Virasoro	338 A	---	2,6 B	---

Letras minúsculas diferentes significan diferencias entre genotipos y/o fecha de cosecha, según Tukey ($p < 0,05$)

Letras mayúsculas diferentes significan diferencias entre genotipos y/o tiempos de almacenamiento, según Tukey ($p < 0,05$)

III.F. DISCUSIÓN

La respuesta germinativa ante la escarificación o la extracción de la lema resultó diferente entre genotipos (Figura III.1), mostrando gran variabilidad desde *ssp. flavescens* que incrementa su germinación prácticamente sólo ante la extracción de la

lema, hasta el biotipo Chirú que no mostró incidencia alguna de las cubiertas en su germinación. Las diferencias intra-específicas en las características del fenómeno de dormición están muy generalizadas, como se ha observado entre poblaciones de *Dactylis glomerata* L. (Probert et al., 1985), y entre variedades de *Panicum virgatum* L. (Seepaul et al., 2011). Milberg y Andersson (1998) demostraron que 23 de 33 especies de malezas evaluadas presentaron diferencias entre poblaciones en la respuesta a tratamientos que afectan el nivel de dormición. Los resultados obtenidos sugieren que los distintos genotipos de *P. dilatatum* presentarían diferentes grados de incidencia de sus cubiertas sobre la dormición, similar a lo sugerido para *Panicum miliaceum* L. (Khan et al., 1997).

Se constató que los clones pentaploides de *P. dilatatum* presentaron incrementos en la germinación de semillas sin lema ante mayor tiempo de almacenamiento, pero no hubo incrementos para los biotipos Virasoro, Chirú y ssp. *flavescens* (Figura III.1 A y B). Este efecto del almacenamiento sobre los pentaploides fue similar a lo reportado para semillas sin cubiertas de dos especies de *Digitaria* (Baskin et al., 1969). En *P. notatum*, se sugirió que el almacenamiento afecta a las cubiertas, debilitando las fibras que conforman la “tapa de germinación” presente en la lema de semillas de paníceas (West y Marousky, 1989). Sin embargo, la interacción entre el tiempo de almacenamiento y los tratamientos sobre las semillas de los clones pentaploides no resultó significativa, sugiriendo que la posmaduración provocada por el almacenamiento incidiría sobre el cariopse. En trabajos con semillas de *Digitaria sanguinalis* (L.) Scop. también se ha sugerido que la lema y la pálea resultan un impedimento para la germinación, pero las envolturas propias del cariopse desnudo tienen incidencia sobre la dormición (Gallart et al., 2008). Estas estructuras podrían estar afectando el intercambio gaseoso de las semillas, considerado como otro mecanismo de dormición por cubiertas propuesto para cereales y también para paníceas (Whiteman y Mendra, 1982, Benech-Arnold et al., 2006).

Las semillas enteras y escarificadas presentaron el antecio fértil íntegro, o sea, lema y pálea aparentemente unidas. A pesar de esto, los biotipos de *P. dilatatum* ensayados lograron absorber agua en un lapso de tiempo breve (al menos 24 h), sugiriendo que

las cubiertas no resultaron impermeables a la entrada de agua, coincidiendo con Schrauf et al. (1995) y Kalmbacher et al. (1999). De todas formas, la entrada de agua resultó más rápida cuando las cubiertas fueron extraídas (Figura III.2), y por tanto las cubiertas presentan una resistencia al flujo de agua, como fue sugerido para otras paníceas (West y Marousky, 1989, Khan et al., 1997). Las diferencias constatadas entre los genotipos en la respuesta germinativa no parecieron reflejadas en la tasa de imbibición. En consecuencia, no resulta razonable sugerir la impermeabilidad de las cubiertas como mecanismo de dormición.

En todos los ensayos realizados se utilizaron los biotipos Virasoro y ssp. *flavescens*, debido a que son biotipos sexuales que presentan relación con algunos de los clones pentaploides menores y se encuentran restringidos geográficamente en áreas distantes, por tanto, genéticamente aislados (Speranza, 2009). La característica de prosperar en ambientes diferentes podría estar asociada a requerimientos para la germinación diferentes (Hacker, 1984). En primera instancia, no se registraron diferencias en la germinación de semillas sin lema entre estos biotipos, ni hubo un incremento en la germinación de las mismas ante la posmaduración. Sin embargo, la respuesta germinativa fue diferente para semillas enteras, donde ssp. *flavescens* muestra escasa germinabilidad (2 % promedio), mientras que Virasoro presentó 31 % de germinación en promedio, sugiriendo una incidencia mayor de las cubiertas en ssp. *flavescens*. En segundo lugar, semillas sin lema de ambos biotipos germinaron en oscuridad y temperaturas constantes de 20 °C (Tabla III.1). La luz y temperaturas alternantes, considerados como factores que terminan la dormición o promueven la germinación (Batlla y Banech-Arnold, 2010), son requeridas para una óptima germinación en *P. dilatatum* y otras especies de *Paspalum*, (Fulbright y Flenniken, 1988, Marousky y West, 1988, Schrauf et al., 1995). Por tanto, la extracción de la lema habría resultado en una pérdida de dichos requerimientos para germinar, similar a lo evidenciado en semillas sin cubiertas de *Echinochloa turnerana* (Domin.) J. M. Black, que también logran germinar en la oscuridad (Conover y Geiger, 1984). En último lugar, las semillas con un mes de almacenadas de ambos biotipos presentaron inhibición de la germinación con 10 μ M de ABA, similar a lo reportado en *Panicum*

coloratum L. (Sarath et al., 2006), pero no hubo efecto de la hormona sobre semillas con 5 meses de almacenadas (Tabla III.1). Esto sugiere que habría una menor sensibilidad al ABA de las semillas con 5 meses, lo que se traduce en un nivel de dormición menor tal como ha sido reportado en otras especies (Finch-Savage y Leubner-Metzger, 2006, Gianinetti y Vernieri, 2007, Goggin et al., 2009). Por otra parte, las semillas sin lema no mostraron una respuesta al ABA diferente a las semillas enteras (Tabla III.1), sugiriendo que el rol que ejercen las cubiertas no interactuaría con la sensibilidad al ABA. Al analizar las características físicas de las cubiertas (Tabla III.2), se infiere que la respuesta germinativa contrastante de estos biotipos no serían debidas a diferencias en el espesor de las lemas, tal como fue reportado para *Oryzopsis hymenoides* Roem. & Schult. (Jones y Nielson, 1999), mientras que por las diferencias en el peso, se podría afirmar que las lemas de ssp. *flavescens* resultaron más densas, pero sólo las provenientes de semillas cosechadas en verano, no explicándose por esta variable la germinación de las semillas cosechadas en otoño.

III.G. CONCLUSIONES

La lema impone una importante parte del impedimento a la germinación que experimentan las semillas de diferentes genotipos de *P. dilatatum*, excepto en el biotipo Chirú, que evidenció un nivel de dormición bajo para las condiciones ensayadas. Las cubiertas no resultaron impermeables al agua, no interfieren con el ABA exógeno y la ausencia de las mismas permite la germinación, aún sin factores que terminen la dormición como la luz. Por otra parte, la posmaduración provocada por el almacenamiento en seco actuaría a nivel del cariopse, aunque no es posible descartar un efecto sobre las cubiertas. En conclusión, se sugiere que la dormición de semillas de *P. dilatatum* sería una resultante de la interacción entre las cubiertas y estructuras del cariopse con el embrión, similar a lo propuesto para *Digitaria milanjiana* (Rendle.) Stapf. (Hacker, 1984) y *Setaria faberii* Herrm. (Dekker et al., 1996), donde el rol de la lema sería una restricción mecánica al crecimiento del embrión. Se requerirán futuros trabajos para inferir el mecanismo de dormición

preciso para esta especie, entre ellos evaluar si existe un efecto de las cubiertas sobre el intercambio gaseoso.

III.H. BIBLIOGRAFÍA

Adkins SW, Bellairs SM, Loch DS. 2002. Seed dormancy mechanisms in warm season grass species. *Euphytica*, 126(1): 13–20.

Baskin JM, Schank S, West S. 1969. Seed dormancy in two species of *Digitaria* from Africa. *Crop Science*, 9(5): 584–586.

Batlla D, Benech-Arnold RL. 2010. Predicting changes in dormancy level in natural seed soil banks. *Plant Molecular Biology*, 73(1-2): 3–13.

Benech-Arnold RL, Gualano N, Leymarie J, Côme D, Corbineau F. 2006. Hypoxia interferes with ABA metabolism and increases ABA sensitivity in embryos of dormant barley grains. *Journal of Experimental Botany*, 57(6): 1423–1430.

Campbell BD, Mitchell ND, Field TR. 1999. Climate profiles of temperate C3 and subtropical C4 species in New Zealand pastures. *New Zealand Journal of Agricultural Research*, 42(3): 223–233.

Conover D, Geiger D. 1984. Germination of australian channel millet (*Echinochloa turnerana* (Domin) JM Black) seeds. I. Dormancy in relation to light and water. *Australian Journal of Plant Physiology*, 11(5): 395–408.

Dekker J, Dekker B, Hilhorst H, Karssen C. 1996. Weedy adaptation in *Setaria* spp. IV. Changes in the germinative capacity of *S. faberii* (Poaceae) embryos with development from anthesis to after abscission. *American Journal of Botany*, 83(8): 979–991.

Finch-Savage WE, Leubner-Metzger G. 2006. Seed dormancy and the control of germination. *New Phytologist*, 171(3): 501–523.

- Foley ME.** 2001. Seed dormancy: An update on terminology, physiological genetics, and quantitative trait loci regulating germinability. *Weed Science*, 49(3): 305–317.
- Fulbright T, Flenniken K.** 1988. Causes of dormancy in *Paspalum plicatulum* (Poaceae) seeds. *The Southwestern Naturalist*, 33(1): 35–39.
- Gallart M, Verdu A, Mas MT.** 2008. Dormancy breaking in *Digitaria sanguinalis* seeds: The role of the caryopsis covering structures. *Seed Science and Technology*, 36(2): 259–270.
- Gepts P.** 2004. Crop domestication as a long-term selection experiment. En: Janick J. (Ed.). Plant breeding reviews: Long-term selection: Crops, animals, and bacteria, volume 24, part 2. Oxford: Wiley and Sons. 1–44.
- Gianinetti A, Vernieri P.** 2007. On the role of abscisic acid in seed dormancy of red rice. *Journal of Experimental Botany*, 58(12): 3449–3462.
- Goggin DE, Steadman KJ, Emery RJ, Farrow SC, Benech-Arnold RL, Powles SB.** 2009. ABA inhibits germination but not dormancy release in mature imbibed seeds of *Lolium rigidum* Gaud. *Journal of Experimental Botany*, 60(12): 3387–3396.
- Hacker J.** 1984. Genetic variation in seed dormancy in *Digitaria milaniana* in relation to rainfall at the collection site. *Journal of Applied Ecology*, 21(3): 947–959.
- Hilhorst H.** 1995. A critical update on seed dormancy. I. Primary dormancy. *Seed Science Research*, 5(2): 61–73.
- Huang WZ, Hsiao AI.** 1987. Factors affecting seed dormancy and germination of *Paspalum distichum*. *Weed Research*, 27(6): 405–415.
- Jones T, Nielson D.** 1999. Intrapopulation genetic variation for seed dormancy in indian ricegrass. *Journal of Range Management*, 52(6): 646–650.

- Kalmbacher RS, West S, Martin FG.** 1999. Seed dormancy and aging in *Atractodes* Paspalum. *Crop Science*, 39(6): 1847–1852.
- Khan M, Cavers PB, Kane M, Thompson K.** 1997. Role of the pigmented seed coat of Proso millet (*Panicum miliaceum* L.) in imbibition, germination and seed persistence. *Seed Science Research*, 7(1): 21–25.
- Loch DS, Adkins SW, Heslehurst M, Paterson M, Bellairs S.** 2004. Seed formation, development, and germination. En: Moser L, Burson B, Sollenberger L. (Eds.). Warm-season (C4) grasses. Madison, Wisconsin: Agronomy Society of America, Inc. 95–144.
- Loreti J, Oosterheld M.** 1996. Intraspecific variation in the resistance to flooding and drought in populations of *Paspalum dilatatum* from different topographic positions. *Oecologia*, 108(2): 279–284.
- Maeda J, Pereira M, Medina P.** 1997. Seed dormancy and storage of *Paspalum notatum* Flüggé. *Revista Brasileira de Sementes*, 19(2): 164–170.
- Marousky F, West S.** 1988. Germination of bahiagrass in response to temperature and scarification. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 113(6): 845–849.
- Milberg P, Andersson L.** 1998. Does cold stratification level out differences in seed germinability between populations? *Plant Ecology*, 134(2): 225–234.
- Pearson C, Shah S.** 1981. Effects of temperature on seed production, seed quality and growth of *Paspalum dilatatum*. *Journal of Applied Ecology*, 18(3): 897–905.
- Probert RJ, Smith RD, Birch P.** 1985. Germination responses to light and alternating temperatures in european populations of *Dactylis glomerata* L. I. Variability in relation to origin. *New Phytologist*, 99(2): 305–316.

- Sarath G, Hou G, Baird LM, Mitchell RB.** 2007. Reactive oxygen species, ABA and nitric oxide interactions on the germination of warm-season C4 grasses. *Planta*, 226(3): 697–708.
- Sarath G, Bethke PC, Jones R, Baird LM, Hou G, Mitchell RB.** 2006. Nitric oxide accelerates seed germination in warm-season grasses. *Planta*, 223(6): 1154–1164.
- Schrauf GE, Cornaglia PS, Deregibus VA, Ríssola MG.** 1995. Improvement in germination behaviour of *Paspalum dilatatum* Poir. seeds under different pre-conditioning treatments. *New Zealand Journal of Agricultural Research*, 38(4): 501–509.
- Seepaul R, Macoon B, Reddy KR, Baldwin B.** 2011. Switchgrass (*Panicum virgatum* L.) intraspecific variation and thermotolerance classification using *in vitro* seed germination assay. *American Journal of Plant Sciences*, 2(2): 134–147.
- Speranza PR.** 2009. Evolutionary patterns in the Dilatata group (*Paspalum*, Poaceae). *Plant Systematics and Evolution*, 282(1-2): 43–56.
- Speranza PR.** 2005. The challenges of the exploration of genetic resources in apomictic plants: Lessons from *Paspalum dilatatum*. *Agrociencia*, 9(1-2): 73–76.
- Tischler C, Burson BL.** 1999. Seed dormancy and germination of dallisgrass, *Paspalum dilatatum*, stored under differing conditions. *Seed Science and Technology*, 27(1): 263–271.
- Tischler C, Young B.** 1983. Effects of chemical and physical treatments on germination of freshly-harvested kleingrass seed. *Crop Science*, 23(4): 789–792

West S, Marousky F. 1989. Mechanism of dormancy in Pensacola bahiagrass. *Crop Science*, 29(3): 787–791.

Whiteman P, Mendra K. 1982. Effects of storage and seed treatments on germination of *Brachiaria decumbens*. *Seed Science and Technology*, 10(2): 233–242.

IV. CONCLUSIONES GENERALES Y PERSPECTIVA A FUTURO

Los resultados presentados en el Capítulo II y III nos permiten concluir que existe variabilidad en el comportamiento germinativo entre genotipos de *P. dilatatum*. A su vez, se comprobó que existen diferencias entre genotipos en el tiempo de almacenamiento requerido para que las semillas alcancen su mayor germinabilidad, o sea, su menor nivel de dormición. Estos resultados tienen implicancias en el futuro manejo de esta especie, ya que se deberá identificar las características más adecuadas de ambiente para la siembra y el tiempo de almacenamiento requerido para un genotipo particular. Virasoro y Chirú se destacaron como diferentes al resto, mientras que ssp. *flavescens* y Uruguaiana resultaron más parecidos al comportamiento germinativo presentado por los clones pentaploides. Chirú, en particular, fue el único genotipo que no presentó diferencias entre tratamientos de pre-imbibición, ni de escarificación, además de registrar altos porcentajes de germinación, sugiriendo que su dormición es menor a los restantes genotipos. Se destacó el tratamiento de pre-imbibición a 20 °C, provocando incrementos de la germinación para los quince genotipos restantes. Actualmente, éste tratamiento es aplicado en nuestro laboratorio cuando se pretende obtener una alta germinación de semillas de *P. dilatatum* y otras especies cercanas, mientras que se planifican trabajos a futuro podrán dilucidar cómo es la respuesta germinativa ante otras temperaturas de pre-imbibición. A su vez, hubo comportamientos germinativos levemente divergentes entre clones pentaploides recombinantes pertenecientes a un mismo grupo genético. Esto nos permite pensar que sería posible encontrar en la región alguna accesión pentaploide fuera de tipo que pueda presentar una menor dormición y que mantenga las características forrajeras, la cual sería una candidata atractiva para el proceso de domesticación.

Por otro lado, las cubiertas afectan la germinación con diferente magnitud según el genotipo, pero esta resistencia a la germinación no estaría asociada con evitar la imbibición. La lema parece actuar como una resistencia mecánica a la germinación. A pesar de que su influencia es clara, la dormición de cada genotipo no se explicaría sólo por las características de las cubiertas. Los tejidos que componen el cariopse en interacción con el embrión parecen tener cierto rol sobre el nivel de dormición, dado

que la posmaduración tendría efecto sobre el cariopse y/o sobre el embrión. La posmaduración no pareció incidir sobre las cubiertas, aunque las evidencias mostradas no permiten descartar esta hipótesis.

La información que se desprende del presente trabajo será de utilidad para comenzar nuevos procesos de domesticación, no sólo para *P. dilatatum* sino para otras especies silvestres, los cuales tendrán en cuenta la germinabilidad del biotipo de interés, además de las características productivas y de tolerancia al estrés de las plantas adultas. Para nuestro trabajo, resultó útil el actual marco teórico de la dormición que permitió entender y diferenciar el comportamiento germinativo mostrado por los genotipos. Sin embargo, se requerirán mayores esfuerzos en el estudio de la fisiología de la germinación y la dormición de esta especie, para dilucidar cuáles son las diferencias fisiológicas entre genotipos. Por un lado, se requerirá información sobre la germinación y emergencia en condiciones de campo, mediante experimentos que logren manejar como variables los factores de mayor relevancia para la germinación en condiciones controladas, como la disponibilidad de agua, las temperaturas y el genotipo de las semillas. Además, se podrían estimar los umbrales de temperatura y potencial hídrico para la germinación de los genotipos más atractivos, tomando en cuenta los modelos poblacionales mencionados en I.B.4. Estos parámetros de umbral resultan informativos para predecir el momento de emergencia ante un ambiente dado, siendo útiles para la toma de decisiones a nivel productivo. También, sería interesante conocer el tiempo y el ambiente de almacenamiento más adecuado para cada genotipo que se requiere para disminuir su dormición lo suficiente para una instalación exitosa. Por último, se podría dilucidar los mecanismos fisiológicos que determinan el nivel de dormición de cada genotipo de interés, mediante trabajos de laboratorio que involucren ensayos de germinación de semillas y de embriones aislados con hormonas (ABA y giberelinas) y otros inhibidores o promotores de la germinación, y poder detectar diferencias en la expresión de algunos genes, entre semillas con alto y bajo nivel de dormición.

V. BIBLIOGRAFÍA

- Adkins SW, Bellairs SM, Loch DS. 2002. Seed Dormancy Mechanisms in Warm Season Grass Species. *Euphytica*, 126(1): 13–20
- Alboresi A, Gestin C, Leydecker M-T, Bedu M, Meyer C, Truong H-N. 2005. Nitrate, A Signal Relieving Seed Dormancy in *Arabidopsis*. *Plant, Cell and Environment*, 28(4): 500–512
- Ali-Rachedi S, Bouinot D, Wagner M, Bonnet M, Sotta B, Grappin P, Jullien M. 2004. Changes in Endogenous Abscisic Acid Levels during Dormancy Release and Maintenance of Mature Seeds: Studies with the Cape Verde Islands Ecotype, the Dormant Model of *Arabidopsis thaliana*. *Planta*, 219(3): 479–488
- Allen PS, Meyer SE, Beckstead J. 1995. Patterns of Seed After-Ripening in *Bromus tectorum* L. *Journal of Experimental Botany*, 46(292): 1737–1744
- Alonso S, Monterubbianesi M. 2006. Phenotypic Variability in Leaf Length, Width and Area and Their Relationships in Clones of Two Subspecies of *Paspalum dilatatum* During Summer and Autumn. *New Zealand Journal of Agricultural Research*, 49(1): 25–33
- Andersson L, Milberg P. 1998. Variation in Seed Dormancy among Mother Plants, Populations and Years of Seed Collection. *Seed Science Research*, 8(1): 29–38
- Asker SE, Jerling L. 1992. *Apomixis in Plants*. Boca Raton, Florida: CRC Press. 298p.
- Bashaw E, Forbes I. 1958. Chromosome Numbers and Microsporogenesis in Dallisgrass *Paspalum dilatatum* Poir. *Agronomy Journal*, 50(8): 441–445
- Bashaw E, Holt E. 1958. Megasporogenesis, Embryo Sac Development and Embryogenesis in Dallisgrass, *Paspalum dilatatum*, Poir. *Agronomy Journal*, 50(12): 753–756

- Baskin CC, Baskin JM. 2000. *Seeds: Ecology, Biogeography, and Evolution of Dormancy and Germination*. San Diego: Elsevier. 666p.
- Baskin JM, Baskin CC. 2004. A Classification System for Seed Dormancy. *Seed Science Research*, 14(1): 1–16
- Baskin JM, Schank S, West S. 1969. Seed Dormancy in Two Species of *Digitaria* from Africa. *Crop Science*, 9(5): 584–586.
- Batak I, Dević M, Giba Z, Grubisić A, Poff KL, Konjević R. 2002. The Effects of Potassium Nitrate and NO-Donors on Phytochrome A- and Phytochrome B-Specific Induced Germination of *Arabidopsis thaliana* Seeds. *Seed Science Research*, 12(4): 253–259
- Batlla D, Benech-Arnold RL. 2010. Predicting Changes in Dormancy Level in Natural Seed Soil Banks. *Plant Molecular Biology*, 73(1-2): 3–13
- Beckman JJ, Moser LE, Kubik K, Waller SS. 1993. Big Bluestem and Switchgrass Establishment As Influenced by Seed Priming. *Agronomy Journal*, 85(2): 199–202
- Benech-Arnold RL, Gualano N, Leymarie J, Côme D, Corbineau F. 2006. Hypoxia Interferes with ABA Metabolism and Increases ABA Sensitivity in Embryos of Dormant Barley Grains. *Journal of Experimental Botany*, 57(6): 1423–1430
- Benech-Arnold RL, Sánchez RA, Forcella F, Kruk BC, Ghera CM. 2000. Environmental Control of Dormancy in Weed Seed Banks in Soil. *Field Crops Research*, 67(2): 105–122
- Benech-Arnold RL, Ghera CM, Sánchez RA, Insausti P. 1990. Temperature Effects on Dormancy Release and Germination Rate in *Sorghum halepense* (L.) Pers. Seeds: A Quantitative Analysis. *Weed Research*, 30(2): 81–89
- Bennett H. 1959. The Effect of Temperature upon Flowering in *Paspalum*. *Agronomy Journal*, 51(4): 191–193

- Bentsink L, Koornneef M. 2011. Identification and Characterization of Quantitative Trait Loci That Control Seed Dormancy in Arabidopsis. En: Kermode AR. (Ed.). Seed Dormancy: Methods and Protocols. New York: Humana Press. 165–184
- Bewley JD. 1997. Seed Germination and Dormancy. *The Plant Cell*, 9(7): 1055-1066
- Bewley JD, Black M. 1994. Seeds: Physiology of Development and Germination. 2nd Edition. New York: Plenum Press. 467p.
- Blaikie S, Martin F, Mason W, Connor D. 1988. Effects of Soil Water Supply and Temperature on the Photosynthesis of White Clover and Paspalum in Irrigated Pastures. *Australian Journal of Experimental Agriculture*, 28(3): 321–326
- Blumenthal A, Lerner H, Werker E, Poljakoff-Mayber A. 1986. Germination Preventing Mechanisms in Iris Seeds. *Annals of Botany*, 58(4): 551–561
- Bradford KJ. 2002. Applications of Hydrothermal Time to Quantifying and Modeling Seed Germination and Dormancy. *Weed Science*, 50(2): 248–260
- Burson BL. 1991. Homology of Chromosomes of the X Genomes in Common and Uruguayan Dallisgrass, *Paspalum dilatatum*. *Genome*, 34(6): 950–953
- Burson BL, Correa J, Potts H. 1978. Anatomical Study of Seed Shattering in Bahiagrass and Dallisgrass. *Crop Science*, 18(1): 122–125
- Burson BL, Lee H, Bennett H. 1973. Genome Relations between Tetraploid *Paspalum dilatatum* and Four Diploid *Paspalum* Species. *Crop Science*, 13(6): 739–743
- Campbell BD, Mitchell ND, Field TR. 1999. Climate Profiles of Temperate C3 and Subtropical C4 Species in New Zealand Pastures. *New Zealand Journal of Agricultural Research*, 42(3): 223–233

- Campbell LR. 1999. *Paspalum dilatatum* and *Axonopus affinis* in Australia. En: Loch DS, Ferguson J. (Eds.). Forage Seed Production. 2. Tropical and Subtropical Species. Wallingford, UK: CABI Publishing. 325–333
- Caponio I, Quarin C. 1990. Intra- and Interspecific Hybridization between Dallisgrass and Vaseygrass. *Crop Science*, 30(2): 362–364
- Carámbula M. 2002. Pasturas y forrajes. Tomo I. Potenciales y alternativas para producir forraje. Montevideo: Ed. Hemisferio Sur. 357p.
- Carrera E, Holman T, Medhurst A, Dietrich D, Footitt S, Theodoulou FL, Holdsworth MJ. 2008. Seed After-Ripening Is A Discrete Developmental Pathway Associated with Specific Gene Networks in Arabidopsis. *The Plant Journal*, 53(2): 214–224
- Casal J, Sánchez R. 1998. Phytochromes and Seed Germination. *Seed Science Research*, 8(3): 317–329
- Castro AJ, Benítez A, Hayes PM, Viega L, Wright L. 2010. Coincident Quantitative Trait Loci Effects for Dormancy, Water Sensitivity and Malting Quality Traits in the BCD47xBaronesse Barley Mapping Population. *Crop and Pasture Science*, 61(9): 691–699
- Chantre GR, Batlla D, Sabbatini MR, Orioli G. 2009. Germination Parameterization and Development of an After-Ripening Thermal-Time Model for Primary Dormancy Release of *Lithospermum arvense* Seeds. *Annals of Botany*, 103(8): 1291–301
- Cohn MA. 1996. Operational and Philosophical Decisions in Seed Dormancy Research. *Seed Science Research*, 6(4): 147–153
- Coll J. 1991. Producción de semilla de *Paspalum dilatatum*. Montevideo: Serie Técnica INIA, No. 4. 20p.

- Conover D, Geiger D. 1984. Germination of Australian Channel Millet (*Echinochloa turnerana* (Domin) JM Black) Seeds. I. Dormancy in Relation to Light and Water. *Australian Journal of Plant Physiology*, 11(5): 395–408.
- Cornaglia PS, Schrauf GE, Deregibus VA. 2009. Flooding and Grazing Promote Germination and Seedling Establishment in the Perennial Grass *Paspalum dilatatum*. *Austral Ecology*, 34(3): 343–350
- Cornaglia PS, Schrauf GE, Nardi M, Deregibus VA. 2005. Emergence of Dallisgrass as Affected by Soil Water Availability. *Rangeland Ecology and Management*, 58(1): 35–40
- Cornaglia PS. 2003. El pasto miel: características adaptativas. Consideraciones para lograr una implantación exitosa. *Revista Argentina de Producción Animal*, 23(3-4): 143–146
- Cuña M, Muguruza M, Rocha F. 2012. Determinación del desarrollo fenológico de la panoja, curva de caída y calidad de semilla en *Paspalum dilatatum* cv. Chirú y *Paspalum dilatatum* ssp. *flavescens*. Tesis Ing. Agr. Montevideo, Uruguay. Facultad de Agronomía. 91p.
- Dekker J, Dekker B, Hilhorst H, Karssen C. 1996. Weedy Adaptation in *Setaria* spp. IV. Changes in the Germinative Capacity of *S. faberii* (Poaceae) Embryos with Development from Anthesis to After Abscission. *American Journal of Botany*, 83(8): 979–991
- Derckx M, Karssen C. 1994. Are Seasonal Dormancy Patterns in *Arabidopsis thaliana* Regulated by Changes in Seed Sensitivity to Light, Nitrate and Gibberellin? *Annals of Botany*, 73(2): 129–136
- Derckx M, Karssen C. 1993a. Changing Sensitivity to Light and Nitrate but Not to Gibberellins Regulates Seasonal Dormancy Patterns in *Sisymbrium officinale* Seeds. *Plant, Cell and Environment*, 16(5): 469–479

- Derkx M, Karssen C. 1993b. Effects of Light and Temperature on Seed Dormancy and Gibberellin-Stimulated Germination in *Arabidopsis thaliana*: Studies with Gibberellin-Deficient and -Insensitive Mutants. *Physiologia Plantarum*, 89(2): 360–368
- Dungey N, Pinfield N. 1980. The Effect of Temperature on the Supply of Oxygen to Embryos of Intact *Acer pseudoplatanus* L. Seeds. *Journal of Experimental Botany* 31(4): 983–992
- El-Maarouf-Bouteau H, Bailly C. 2008. Oxidative Signaling in Seed Germination and Dormancy. *Plant Signaling and Behavior*, 3(3): 175–182
- Fenner M. 1991. The Effects of the Parent Environment on Seed Germinability. *Seed Science Research*, 1(2): 75–84
- Fennimore S, Foley ME. 1998. Genetic and Physiological Evidence for the Role of Gibberellic Acid in the Germination of Dormant *Avena fatua* Seeds. *Journal of Experimental Botany*, 49(318): 89–94
- Finch-Savage WE, Leubner-Metzger G. 2006. Seed Dormancy and the Control of Germination. *New Phytologist*, 171(3): 501–523
- Finkelstein R, Reeves W, Ariizumi T, Steber C. 2008. Molecular Aspects of Seed Dormancy. *Annual Review of Plant Biology*, 59(1): 387–415
- Foley ME. 2001. Seed Dormancy: An Update on Terminology, Physiological Genetics, and Quantitative Trait Loci Regulating Germinability. *Weed Science*, 49(3): 305–317
- Foley ME. 1994. Temperature and Water Status of Seed Affect After-Ripening in Wild Oat (*Avena fatua*). *Weed Science*, 42(2): 200–204
- Fulbright T, Flenniken K. 1988. Causes of Dormancy in *Paspalum plicatulum* (Poaceae) Seeds. *The Southwestern Naturalist*, 33(1): 35–39

- Fuller DQ, Allaby R. 2009. Seed Dispersal and Crop Domestication: Shattering, Germination and Seasonality in Evolution under Cultivation. En: Østergaard L. (Ed.). Annual Plant Reviews, Volume 38: Fruit Development and Seed Dispersal. Oxford: Wiley-Blackwell. 238–295
- Gallart M, Verdu A, Mas MT. 2008. Dormancy Breaking in *Digitaria sanguinalis* Seeds: The Role of The Caryopsis Covering Structures. Seed Science and Technology, 36(2): 259–270
- García JA. 1995. Gramilla y praderas. Montevideo: Serie Técnica INIA No. 67. 14p.
- García JA. 1971. Influencia de factores ambientales sobre el rendimiento y calidad de semilla en tres biotipos de *Paspalum dilatatum* Poir. Tesis Ing. Agr. Montevideo, Uruguay. Facultad de Agronomía. 128p.
- García MV, Balatti PA, Arturi MJ. 2007. Genetic Variability in Natural Populations of *Paspalum dilatatum* Poir. Analyzed by Means of Morphological Traits and Molecular Markers. Genetic Resources and Crop Evolution, 54(5): 935–946
- Gepts P. 2004. Crop Domestication as a Long-Term Selection Experiment. En: Janick J. (Ed.). Plant Breeding Reviews: Long-Term Selection: Crops, Animals, and Bacteria, Volume 24, Part 2. Oxford: Wiley & Sons. 1–44
- Gianinetti A, Vernieri P. 2007. On the Role of Abscisic Acid in Seed Dormancy of Red Rice. Journal of Experimental Botany, 58(12): 3449–3462.
- Glison N, Viega L, Speranza P. 2011. Preliminar Study of the Effect of the Post-Harvest Period and the Chilling Treatment on the Germination of *Paspalum dilatatum* ssp. *flavescens* Seeds and Other Biotypes. Análisis de Semillas, Volumen 5, Número 17: 71–75
- Goggin DE, Steadman KJ, Emery RJ, Farrow SC, Benech-Arnold RL, Powles SB. 2009. ABA Inhibits Germination but Not Dormancy Release in Mature

- Imbibed Seeds of *Lolium rigidum* Gaud. Journal of Experimental Botany, 60(12): 3387–3396.
- Hacker J. 1984. Genetic Variation in Seed Dormancy in *Digitaria milanjiana* in Relation to Rainfall at the Collection Site. Journal of Applied Ecology, 21(3): 947–959.
- Hickenbick M. 1992. Mode of Reproduction and Seed Production in *Paspalum dilatatum* Poir. Virasoro Biotype – Dilatata Group (Gramineae). Revista Brasileira de Genética, 15(1): 85–102
- Hilhorst H. 1995. A Critical Update on Seed Dormancy. I. Primary Dormancy. Seed Science Research, 5(2): 61–73.
- Holdsworth M, Bentsink L, Soppe W. 2008. Molecular Networks Regulating Arabidopsis Seed Maturation, After-Ripening, Dormancy and Germination. New Phytologist, 179(1): 33–54
- Hsu F, Nelson C, Matches A. 1985. Temperature Effects on Germination of Perennial Warm-Season Forage Grasses. Crop Science, 25(2): 215–220
- Huang WZ, Hsiao AI. 1987. Factors Affecting Seed Dormancy and Germination of *Paspalum distichum*. Weed Research, 27(6): 405–415
- ISTA, International Seed Testing Association. 1999. International Rules for Seed Testing. Seed Science and Technology, 27(Supplement): pp.333
- Jacobsen J, Pearce D, Poole A, Pharis R, Mander L. 2002. Abscisic Acid, Phaseic Acid and Gibberellin Contents Associated with Dormancy and Germination in Barley. Physiologia Plantarum, 115(3): 428–441
- Johnston M, Miller J. 1964. Investigations into Techniques for the Germination of *Paspalum dilatatum*. Proceeding of the International Seed Test Association, 29(1): 145–148

- Johnston W. 1996. The Place of C4 Grasses in Temperate Pastures in Australia. *New Zealand Journal of Agricultural Research*, 39(4): 527–540
- Jones T, Nielson D. 1999. Intrapopulation Genetic Variation for Seed Dormancy in Indian Ricegrass. *Journal of Range Management*, 52(6): 646–650
- Kalmbacher RS, West S, Martin FG. 1999. Seed Dormancy and Aging in *Atractodes Paspalum*. *Crop Science*, 39(6): 1847–1852.
- Kermode AR. 2005. Role of Abscisic Acid in Seed Dormancy. *Journal of Plant Growth Regulation*, 24(4): 319–344
- Khan M, Cavers PB, Kane M, Thompson K. 1997. Role of the Pigmented Seed Coat of Proso Millet (*Panicum miliaceum* L.) in Imbibition, Germination and Seed Persistence. *Seed Science Research*, 7(1): 21–25.
- Kucera B, Cohn MA, Leubner-Metzger G. (2005) Plant Hormone Interactions During Seed Dormancy Release and Germination. *Seed Science Research* 15: 281–307
- Lawson A, Kelly K, Stockdale C. 2003. Management and Role of *Paspalum* in Irrigated Pastures in Northern Victoria, Australia. *Revista Argentina de Producción Animal*, 23(3-4): 129–131
- Le Page-Degivry MT, Garello G. 1992. *In situ* Abscisic Acid Synthesis: A Requirement for Induction of Embryo Dormancy in *Helianthus annuus*. *Plant Physiology*, 98(4): 1386–1390
- Lenoir C, Corbineau F, Côme D. 1986. Barley (*Hordeum vulgare*) Seed Dormancy as Related to Glumella Characteristics. *Physiologia Plantarum*, 68(2): 301–307
- Leon RG, Bassham DC, Owen MD. 2007. Thermal and Hormonal Regulation of the Dormancy-Germination Transition in *Amaranthus tuberculatus* Seeds. *Weed Research*, 47(4): 335–344

- Li B, Foley ME. 1996. Transcriptional and Posttranscriptional Regulation of Dormancy-Associated Gene Expression by After-Ripening in Wild Oat. *Plant Physiology*, 110(4): 1267–1273
- Li CD, Tarr AA, Lance RC, Harasymow SA, Uhlmann JC, Westcot SA, Young KJ, Grime CR, Cakir MB, Broughton SA, Appels R. 2003. A Major QTL Controlling Seed Dormancy and Pre-Harvest Sprouting / Grain α -Amylase in Two-Rowed Barley (*Hordeum vulgare* L.). *Australian Journal of Agricultural Research*, 54(12): 1303–1313
- Loch DS, Adkins SW, Heslehurst M, Paterson M, Bellairs S. 2004. Seed Formation, Development, and Germination. En: Moser L, Burson B, Sollenberger L. (Eds.). *Warm-Season (C4) Grasses*. Madison, Wisconsin: Agronomy Society of America, Inc. 95–144.
- Loch DS, Ferguson J. 1999. Tropical and Subtropical Forage Seed Production: An Overview. En: Loch DS, Ferguson J. (Eds.) *Forage Seed Production*. 2. Tropical and Subtropical Species. Wallingford, UK: CABI Publishing. 1–40
- Loreti J, Oesterheld M. 1996. Intraspecific Variation in the Resistance to Flooding and Drought in Populations of *Paspalum dilatatum* from Different Topographic Positions. *Oecologia*, 108(2): 279–284.
- Luttrell E. 1977. The Disease Cycle and Fungus-Host Relationships in Dallisgrass Ergot. *Phytopathology*, 67(12): 1461–1468
- Machado A, Valls J, Peñaloza A, Santos S. 2005. New Pentaploid Biotypes of the Dilatata Group of *Paspalum* L. (Gramineae) from Southern Brazil. *Ciência Rural*, 35(1): 56–61
- Maeda J, Pereira M, Medina P. 1997. Seed Dormancy and Storage of *Paspalum notatum* Flügge. *Revista Brasileira de Sementes*, 19(2): 164–170

- Marousky F, West S. 1988. Germination of Bahiagrass in Response to Temperature and Scarification. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 113(6): 845–849
- Meyer SE, Allen PS. 2009. Predicting Seed Dormancy Loss and Germination Timing for *Bromus tectorum* in a Semi-Arid Environment Using Hydrothermal Time Models. *Seed Science Research*, 19(4): 225–239
- Michellini D. 2010. Caracterización morfogénica de *Paspalum dilatatum* Poir. Tesis Ing. Agr. Montevideo, Uruguay. Facultad de Agronomía. 107p.
- Milberg P, Andersson L. 1998. Does Cold Stratification Level Out Differences in Seed Germinability Between Populations? *Plant Ecology*, 134(2): 225–234.
- Millar A, Jacobsen J, Ross J, Helliwell C, Poole A, Scofield G, Reid J, Gubler F. 2006. Seed Dormancy and ABA Metabolism in Arabidopsis and Barley: The Role of ABA 8'-Hydroxylase. *The Plant Journal*, 45(6): 942–954
- Mitchell K, Lucanus R. 1962. Growth of Pasture Species under Controlled Environment. III. Growth at Various Levels of Constant Temperature with 8 and 16 Hours of Uniform Light Per Day. *New Zealand Journal of Agricultural Research*, 5(1-2): 37–41
- Ni B, Bradford K. 1993. Dormancy of Abscisic Acid-and Gibberellin-Deficient Mutant Tomato (*Lycopersicon esculentum*) Seeds. Sensitivity of Germination to Abscisic Acid, Gibberellin, and Water Potential. *Plant Physiology*, 101(2): 607–617
- Pearson C, Shah S. 1981. Effects of Temperature on Seed Production, Seed Quality and Growth of *Paspalum dilatatum*. *Journal of Applied Ecology*, 18(3): 897–905
- Percival NS (1977) Survey of Paspalum in New Zealand Pastures. *New Zealand Journal of Experimental Agriculture* 5: 219–226

- Pizarro E. 2000. Potencial forrajero del género *Paspalum*. *Pasturas Tropicales*, 22(1): 38–46
- Probert RJ, Smith RD, Birch P. 1985. Germination Responses to Light and Alternating Temperatures in European Populations of *Dactylis glomerata* L. I. Variability in Relation to Origin. *New Phytologist*, 99(2): 305–316
- Ríos A, Giménez A, Carámbula M, Cibils R. 1990. Dos malezas problema: cuscuta y gramilla. Boletín de divulgación N° 1, INIA La Estanzuela. 19 p.
- Roach D, Wulff R. 1987. Maternal Effects in Plants. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 18: 209–235
- Rodríguez O. 2010. Caracterización morfológica de clones recombinantes de *Paspalum dilatatum* Poir. Tesis Ing. Agr. Montevideo, Uruguay. Facultad de Agronomía. 81p.
- Romagosa I, Prada D, Moralejo MA, Sopena A, Muñoz P, Casas AM, Swanston JS, Molina-Cano JL. 2001. Dormancy, ABA Content and Sensitivity of a Barley Mutant to ABA Application during Seed Development and After-Ripening. *Journal of Experimental Botany*, 52(360): 1499–1506
- Rost T. 1975. The Morphology of Germination in *Setaria lutescens* (Gramineae): The Effects of Covering Structures and Chemical Inhibitors on Dormant and Non-Dormant Florets. *Annals of Botany* 39(1): 21–30
- Roundy B, Biedenbender S. 1996. Germination of Warm-Season Grasses under Constant and Dynamic Temperatures. *Journal of Range Management*, 49(5): 425–431
- Rowley J, Tunnicliffe C, Taylor A. 1975. Freezing Sensitivity of Leaf Tissue of C4 Grasses. *Functional Plant Biology*, 2(4): 447–451

- Santiñaque F. 1979. Estudios sobre productividad y comportamiento de distintas mezclas forrajeras. Tesis Ing. Agr. Montevideo, Uruguay. Facultad de Agronomía. 86 p.
- Sarath G, Mitchell RB. 2008. Aged Switchgrass Seed Lot's Response to Dormancy-Breaking Chemicals. *Seed Technology*, 30(1): 7–16
- Sarath G, Hou G, Baird LM, Mitchell RB. 2007. Reactive Oxygen Species, ABA and Nitric Oxide Interactions on the Germination of Warm-Season C4 Grasses. *Planta*, 226(3): 697–708.
- Sarath G, Bethke PC, Jones R, Baird LM, Hou G, Mitchell RB. 2006. Nitric Oxide Accelerates Seed Germination in Warm-Season Grasses. *Planta*, 223(6): 1154–1164.
- Schopfer P, Plachy C. 1985. Control of Seed Germination by Abscisic Acid. III. Effect on Embryo Growth Potential (Minimum Turgor Pressure) and Growth Coefficient (Cell Wall Extensibility) in *Brassica napus*. *Plant Physiology*, 77(3): 676–686
- Schopfer P, Plachy C. 1984. Control of Seed Germination by Abscisic Acid. II. Effect on Embryo Water Uptake in *Brassica napus* L. *Plant Physiology*, 76(1): 155–160
- Schrauf GE. 2003. Selección, hibridación interespecífica e ingeniería genética en el mejoramiento de pasto miel. *Revista Argentina de Producción Animal* 23(3-4): 153–159
- Schrauf GE, Blanco MA, Cornaglia PS, Deregibus VA, Madia M, Pacheco MG, Padilla J. 2003. Ergot Resistance in Plants of *Paspalum dilatatum* Incorporated by Hybridisation with *Paspalum urvillei*. *Tropical Grasslands*, 37(3): 182–186
- Schrauf GE, Cornaglia PS, Deregibus VA, Rissola MG. 1995. Improvement in Germination Behaviour of *Paspalum dilatatum* Poir. Seeds under Different

- Pre-Conditioning Treatments. *New Zealand Journal of Agricultural Research*, 38(4): 501–509
- Seepaul R, Macoon B, Reddy KR, Baldwin B. 2011. Switchgrass (*Panicum virgatum* L.) Intraspecific Variation and Thermotolerance Classification Using *in vitro* Seed Germination Assay. *American Journal of Plant Sciences*, 2(2): 134–147
- Souza-Chies T, Cavalli-Molina S. 1995. Variability in Seed Production and Germination in *Paspalum* – Dilatata Group (Gramineae). *Revista Brasileira de Biologia*, 55(1): 127–139
- Speranza PR. 2009. Evolutionary Patterns in the Dilatata Group (*Paspalum*, Poaceae). *Plant Systematics and Evolution*, 282(1-2): 43–56
- Speranza PR. 2005a. The Challenges of the Exploration of Genetic Resources in Apomictic Plants: Lessons from *Paspalum dilatatum*. *Agrociencia*, 9(1-2): 73–76
- Speranza PR. 2005b. Evolutionary Patterns in the Dilatata Group (*Paspalum*, Poaceae): A Polyploid/Agamic Complex. PhD. Thesis. Gainesville, USA. University of Florida. 106 p.
- Taylorson R. 1975. Inhibition of Prechill-Induced Dark Germination in *Sorghum halepense* (L.) Pers. Seeds by Phytochrome Transformations. *Plant Physiology*, 55(6): 1093–1097
- Thom ER. 2003. The Place of *Paspalum* in New Zealand Pastures. *Revista Argentina de Producción Animal*, 23(3-4): 131–134
- Thomasson J. 1978. Observations on the Characteristics of the Lemma and Palea of the Late Cenozoic Grass *Panicum elegans*. *American Journal of Botany*, 65(1): 34–39
- Thévenot C. 1982. Correlations Between Axis and Cotyledons in Apple-Embryo Dormancy. *Zeitschrift für Pflanzenphysiologie*, 106(1): 15–26

- Tischler C, Burson BL. 1999. Seed Dormancy and Germination of Dallisgrass, *Paspalum dilatatum*, Stored under Differing Conditions. *Seed Science and Technology*, 27(1): 263–271
- Tischler C, Young B. 1983. Effects of Chemical and Physical Treatments on Germination of Freshly-Harvested Kleingrass Seed. *Crop Science*, 23(4): 789–792
- Turner SR, Merritt DJ, Ridley EC, Commander LE, Baskin JM, Baskin CC, Dixon KW. 2006. Ecophysiology of Seed Dormancy in the Australian Endemic Species *Acanthocarpus preissii* (Dasypogonaceae). *Annals of Botany*, 98(6): 1137–44
- Veasey EA, Karasawa MG, Santos PP, Rosa MS, Mamani E, Oliveira GC. 2004. Variation in the Loss of Seed Dormancy During After-Ripening of Wild and Cultivated Rice Species. *Annals of Botany*, 94(6): 875–882
- Vegis A. 1964. Dormancy in Higher Plants. *Annual Review of Plant Physiology*, 15: 185–224
- Venuto BC, Burson BL, Hussey MA, Redfearn DD, Wyatt WE, Brown LP. 2003. Forage Yield, Nutritive Value, and Grazing Tolerance of Dallisgrass Biotypes. *Crop Science*, 43(1): 295–301
- Vleeshouwers L, Bouwmeester H, Karssen, C. (1995) Redefining Seed Dormancy: An Attempt to Integrate Physiology and Ecology. *Journal of Ecology* 83: 1031–1037
- Walker-Simmons M. 1987. ABA Levels and Sensitivity in Developing Wheat Embryos of Sprouting Resistant and Susceptible Cultivars. *Plant Physiology*, 84(1): 61–66
- West S, Marousky F. 1989. Mechanism of Dormancy in Pensacola Bahiagrass. *Crop Science*, 29(3): 787–791

- Whiteman P, Mendra K. 1982. Effects of Storage and Seed Treatments on Germination of *Brachiaria decumbens*. *Seed Science and Technology*, 10(2): 233–242.
- Williams ED. 1983. Effects of Temperature, Light, Nitrate and Pre-Chilling on Seed Germination of Grassland Plants. *Annals of Applied Biology*, 103(1): 161–172
- Zarnstroff ME, Keys RR, Chamblee DS. 1994. Growth Regulator and Seed Storage Effects on Switchgrass Germination. *Agronomy Journal*, 86(4): 667–672