



Fundación
Miguel Lillo
Tucumán
Argentina

doi

Características morfoanatómicas y químicas del tegumento seminal de *Desmodium incanum* (Fabaceae, Desmodieae) y su asociación con la dormición

Morphoanatomical and chemical characteristics of *Desmodium incanum* (Fabaceae, Desmodieae) seed coat and its association with dormancy

Gillij, Yanina G.^{1*} ; Galussi, Alberto A.¹ ; Perisse, Patricia² 

¹ Universidad Nacional de Entre Ríos, Facultad de Ciencias Agropecuarias, Botánica morfológica. Ruta Prov. 11, km 10,5, (3100) Oro Verde, Paraná, Entre Ríos, Argentina.

² Universidad Nacional de Córdoba, Facultad de Ciencias Agropecuarias, Botánica morfológica. C.C. 509, (5000) Córdoba. Argentina.

* Autor correspondiente: <yanina.gillij@uner.edu.ar>

RESUMEN

Desmodium incanum (Sw.) DC., es una especie de buena calidad forrajera que se caracteriza por la presencia de semillas con diferentes niveles de dormición física. El objetivo del presente trabajo fue conocer las características morfoanatómicas y químicas de los tegumentos seminales asociadas a los niveles de dormición física. Se trabajó con tegumentos de semillas que presentaron diferentes niveles de dormición, clasificándolas de mayor a menor velocidad de hidratación en grados de permeabilidad 1, 2 y 3. Las semillas se cosecharon entre los años 2017 y 2020 en áreas situadas en la provincia de Entre Ríos (Argentina). Para el análisis morfoanatómico de los tegumentos de semillas se utilizaron técnicas de microscopía electrónica de barrido y de transmisión. La determinación de los componentes químicos se realizó según el método de Van Soest para calcular los porcentajes de celulosa, hemicelulosa, lignina, cutina de la pared celular y de contenidos celulares. La determinación de polifenoles totales se realizó utilizando la técnica de Folin-Denis; para taninos condensados se utilizó el método de la vainillina. Los resultados muestran que los tegumentos seminales con mayor impermeabilidad al agua presentaron diferencias en el patrón

► Ref. bibliográfica: Gillij, Y. G.; Galussi, A. A.; Perisse, P. 2023. Características morfoanatómicas y químicas del tegumento seminal de *Desmodium incanum* (Fabaceae, Desmodieae) y su asociación con la dormición. *Lilloa* 60 (2): 241-257. doi: <https://doi.org/10.30550/j.lil/1852>

► Recibido: 19 de septiembre 2023 – Aceptado: 14 de noviembre 2023 – Publicado en línea: 7 de diciembre 2023.

► URL de la revista: <http://lilloa.lillo.org.ar>

► Esta obra está bajo una Licencia Creative Commons Atribución – No Comercial – Sin Obra Derivada 4.0 Internacional.



de ornamentación, macroesclereidas en empalizada con mayor compactación celular, cambios en la disposición en la zona de la lente y mayor grosor de la pared celular. Las osteoesclereidas presentaron un largo y ancho similar. Se detectaron diferencias en las cantidades de taninos (1,6 y 2,3%), sustancias pécticas (9,7 y 15,1%), celulosa (30,9 y 53,5%), hemicelulosa (46,2 y 23,5%) y lignina (0,4 y 0,5%) para el grado 1 y muestras grado 2 y 3 respectivamente. El trabajo evidenció diferencias morfoanatómicas y en las proporciones de las sustancias químicas del tegumento seminal en función del nivel de permeabilidad al agua, aspectos que se asocian a la profundidad de la dormición física.

Palabras clave — Lignina; macroesclereidas; permeabilidad; semillas; tanino.

ABSTRACT

Desmodium incanum (Sw.) DC, is a species of good forage quality characterized by the presence of seeds with different levels of physical dormancy. The aim of this work was to investigate the morphological, anatomical and chemical characteristics of the seminal integuments associated with the levels of physical dormancy. We analyzed seminal integuments that presented different levels of dormancy, classifying them from highest to lowest speed of hydration in degrees of permeability 1, 2 and 3. The seeds were harvested between 2017 and 2020 in areas located in the province of Entre Ríos (Argentina). Scanning and transmission electron microscopy techniques were used to morphoanatomical analyses of seed integuments. The chemical components were determined using to Van Soest methods to calculate the percentages of cellulose, hemicellulose, lignin and cutin of the cell wall and cell contents. The determination of total polyphenols was carried out using the Folin-Denis technique whereas the vanillin method was used for condensed tannins. The results show that the seminal integuments with greater impermeability to water presented differences in the ornamentation pattern, palisade macrosclereids with greater cellular compactness, changes in the arrangement in the lens zone and greater thickness of the cell wall. The osteosclereids presented similar lengths and widths. Differences were detected in the amounts of tannins (1.6 and 2.3%), pectic substances (9.7 and 15.1%), cellulose (30.9 and 53.5%) hemicelluloses (46.2 and 23.5%) and lignin (0.4 y 0.5 %) for grade 1 and grade 2 and 3 samples respectively. This study showed differences in both the morphoanatomical features and the proportions of the chemical components within the seminal integument as a function of the level of water permeability, aspects that are associated with depth of physical dormancy.

Keywords — Lignin; macrosclereids; permeability; seeds; tanins.

INTRODUCCIÓN

Desmodium incanum (Sw.) DC. es una especie forrajera perenne, apetecible y de buena calidad para los animales (Fernández *et al.*, 1988; Scandaliaris *et al.*, 2013). Es muy común en pastizales naturales de la provincia de Entre Ríos. Se ha determinado que las semillas de esta especie, provenientes de los departamentos Paraná y Diamante de la provincia de Entre Ríos, presentan diferente profundidad de dureza física en el tegumento seminal, lo que se refleja en los niveles de dormición (Gillij *et al.*, 2021). Si bien la cubierta de la semilla otorga la defensa primaria contra el medio ambiente adverso, ya que un tegumento duro la protege de la tensión mecánica, los microorganismos y cambios en temperatura y humedad (Yassen *et al.*, 1994) también pueden ser un problema a la hora de la germinación. Esto se debe, en gran medida, a que impide la entrada del oxígeno y del agua necesaria para el desarrollo del embrión y además, ofrece resistencia mecánica al crecimiento de la radícula (Cortés, 1980). El término semilla dura se aplica a la semilla que presenta una cubierta impermeable al agua, que no germina porque su embrión no puede embeber (ISTA, 2016). Esta dormición física, en algunas especies de Fabaceae, se relaciona con diversas características de las semillas, como la anatomía y la composición de sustancias químicas en el tegumento seminal, que ocasionan diferentes grados en la profundidad de la dormición (Galussi *et al.*, 2019; Gillij *et al.*, 2021).

En la naturaleza, las semillas de una misma especie pueden desarrollarse bajo diferentes condiciones ambientales, lo que provoca diferencias en la dureza del tegumento seminal y en la dormición física asociada (Quinlivan, 1971).

La dormición representa un mecanismo ecológico fundamental, que permite en el largo plazo el mantenimiento de bancos de semillas en condiciones naturales. Esta característica se encuentra en semillas de especies de las familias Convolvulaceae, Chenopodiaceae, Fabaceae, Liliaceae, Malvaceae, Solanaceae (Nikolaeva, 1980; Popinigis, 1985; Besnier Romero, 1989; Zimmermann *et al.*, 1998; Baskin y Baskin, 2004; Zeng *et al.*, 2005; Pérez -García, 2008; ISTA, 2016; Orsenigo *et al.*, 2019; Paul *et al.*, 2019).

La presencia de semillas duras en las especies anuales invernales de Fabaceae, es un mecanismo de supervivencia fundamental ya que les permite mantener una gran longevidad en el suelo (Carámbula, 1977). En el análisis de germinación en algunas especies de Fabaceae, se menciona la presencia de semillas duras como manifestación de dormición física (Galussi *et al.*, 2013a, 2013b; Galindez *et al.*, 2016; Orsenigo *et al.*, 2019; Paul *et al.*, 2019).

Los tejidos del tegumento seminal en Fabaceae según Esau (1987) y Cortés (1980), mantienen una distribución particular: la epidermis constituida por una capa de macroesclereidas, debajo la hipodermis compuesta por una o más capas de osteoesclereidas e internamente se dispone parénquima lagunoso. Las paredes secundarias de las macroesclereidas y osteoesclereidas pueden tener variaciones en el espesor y en los contenidos de celulosa, hemicelulosa, lignina, taninos, cutina y sustancias pécticas; características que se relacionan con la dormición, dureza y resistencia mecánica (Salisbury y Ross, 1992; Taiz y Zeiger, 1998; Galussi *et al.*, 2015). En este sentido, Van Assche *et al.* (2003) menciona la presencia de taninos

condensados (compuestos fenólicos) en la cubierta seminal de *Lotus corniculatus* L. La impregnación de estas sustancias en las paredes secundarias de la semilla le confiere características impermeables (Zavaleta *et al.*, 2003).

Las semillas de *D. incanum* producidas en áreas naturales de la región comprendida entre las localidades de Colonia Ensayo y Paraná presentaron un elevado porcentaje de semillas duras (cerca al 95%) con un 90% de embriones viables (Gillij *et al.*, 2021). El modelo de permeabilidad al agua propuesto por Gillij *et al.* (2021) mostró dureza física de diferentes profundidades en el tegumento seminal, que se tradujo en la ruptura lenta de la dormición y el desarrollo de plántulas normales aun después de 22 meses de almacenamiento. Esta variabilidad hallada en las semillas pertenecientes a una población, coincide con lo mencionado por diversos autores en otras especies de Fabaceae (Nikolaeva, 1980; Moreira de Carvalho y Nakagawa, 1988; Côme y Courbineau, 1992; Galussi *et al.*, 2019). Teniendo en cuenta estos antecedentes, se desprende que las causas relacionadas con el impedimento a la entrada de agua en las semillas de la especie no están completamente dilucidadas. Por esto, se propuso conocer las características anatómicas y químicas de los tegumentos seminales asociados a los niveles de dormición física en semillas de *D. incanum*.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material biológico

Se trabajó con semillas de *Desmodium incanum* (Sw.) DC. cosechadas manualmente entre los años 2017-2020, en las localidades de Colonia Ensayo (31°51'14,0"S y 60°33'02,0"O) a 100,1 m snm y Paraná (31°45'44,0"S y 60°31'57,0"O) a 93,1 m snm en la provincia de Entre Ríos (Argentina). En los periodos reproductivos durante los ensayos (noviembre-febrero), la humedad relativa osciló entre el 60 y 72% con temperaturas ambientales promedio de 24 ± 4 °C y precipitaciones de 49 mm a 240 mm. La precipitación anual promedio osciló entre 1088 mm y 1314 mm para los años en estudio (INTA, EEA Paraná, 2017-2020).

Las semillas seleccionadas para este estudio se observaron con microscopio estereoscópico (lupa 10x) y se descartaron aquellas con daños físicos visibles.

Determinación de niveles (grados) de permeabilidad

Los grados de permeabilidad fueron establecidos acorde a los propuestos por Gillij *et al.* (2021); para ello, en el tiempo cero, inicio del ensayo, las semillas se colocaron en agua destilada a temperatura ambiente en vasos de precipitado de 200 ml, el agua se renovó cada 72 h. Luego, se registró el tiempo transcurrido hasta la imbibición, clasificando y seleccionando las semillas por nivel de permeabilidad según la velocidad de hidratación: grado 1: semillas que se hidrataron completamente antes o hasta 240 h (10 días) de inmersión; grado 2: semillas que se hidrataron entre 1000 h (42 días) y hasta las 5000 h (208 días) de inmersión y grado 3: semillas que aun luego de 6456 h (269 días) de inmersión (momento en que se dio por finalizado el ensayo) no embebieron agua.

Estudio de los tegumentos seminales

1) Análisis morfológicos y anatómicos del tegumento seminal con microscopía electrónica de barrido (MEB).— Considerando una semilla por replica, se analizaron por triplicado tegumentos pertenecientes a los grados 1 y 3 de permeabilidad.

Para la obtención de tegumentos con grado 1 de permeabilidad, se seleccionaron semillas hidratadas en las primeras 240 h y se colocaron en papel de germinación humedecido, enrollado y puestos en bolsa de nylon. Se ubicaron en cámara de germinación (25 °C) en un ángulo de 45°. Posteriormente los tegumentos desprendidos de las plántulas germinadas se recolectaron en cajas de Petri y se secaron en estufa a 25 °C.

Para la colecta de tegumentos con grado 3 de permeabilidad, se seleccionaron aquellas semillas que no embebieron a las 6456 h, a las mismas se les hizo un corte en el tegumento en la zona distal de los cotiledones, y se dejaron 4 h en agua destilada para la imbibición. Luego se pusieron a germinar, y se procedió del mismo modo que para la obtención de tegumentos de grado 1.

Las muestras se sumergieron en nitrógeno líquido y luego se fracturaron con bisturí. Posteriormente, las secciones se adhirieron con cinta doble faz de grafito y cinta de aluminio sobre un soporte y luego se metalizaron con Au (oro) en un Sputter Coater en Plasma de Argón -aproximadamente 200 Å de espesor- (Sorrivas y Morales, 1986). Se observó, fotografió y comparó cada tegumento seminal en vista superficial y lateral con diferentes aumentos. En sección transversal se identificaron los estratos celulares y las dimensiones de las células presentes. La zona seleccionada para estos estudios fue cercana al punto central (Aniszewski, 2009), observándose el área circundante a dicho punto y la lente.

Los tegumentos seminales se examinaron con un microscopio electrónico de barrido, marca JEOL, modelo JSM-35C. Los registros fotográficos se realizaron con microscopio marca LEO, modelo EVO 40 X VP (Cambridge, England, 2003).

2) Pared celular de las macrosclereidas en cortes transversales con microscopio electrónico de transmisión (MET).— Los tegumentos seleccionados según los grados de permeabilidad (1 y 3), se hidrataron por cuatro días en agua destilada. Luego, se cortó una pieza de tegumento con una hoja de afeitar en trozos de 0,5 mm de lado y se colocó durante 24 h en la solución fijadora (glutaraldehído al 2,5% en tampón fosfato de sodio 0,1 M, pH 7,2). Posteriormente, se realizaron 3 lavados de 15 min con la solución tampón. A continuación, se realizó una post-fijación con tetróxido de osmio 2% por 2 h y se lavó con agua destilada (2 h). Se deshidrató en una serie de concentraciones crecientes de acetona (25%, 50%, 80% y 100%) tres veces, por 15 minutos cada vez. Se incluyó en resina Spurr (Spurr, 1969) en vacío en concentraciones ascendentes de resina (R) - acetona (A) [2A: 1R (2 h); 1A: 1R (2 h); 1A: 2R (16 h)] y finalmente en resina pura 8 h en estufa a 70 °C (16 h). Con posterioridad, se realizaron secciones ultrafinas (75 a 90 nm) con un ultramicrotomo LKB con cuchilla de diamante. El contraste se realizó con acetato de uranilo, solución saturada en agua, por un minuto y citrato de plomo por un minuto. Las observaciones se llevaron a cabo en un microscopio electrónico de transmisión marca JEOL 100 CXII a 80 KV.

El espesor del tegumento seminal se obtuvo promediando los valores obtenidos de tres semillas correspondientes a cada grado de permeabilidad (1 y 3). Los promedios de la longitud y el ancho de las macrosclereidas y osteoesclereidas, se calcularon a partir del registro de cuatro células de cada replica ($n=12$ para cada nivel de permeabilidad). El grosor de la pared celular de las macrosclereidas se obtuvo considerando tres células para cada replica realizada ($n=9$ para cada nivel de permeabilidad) y tomando los valores mínimos y máximos. Las medidas de longitud se obtuvieron mediante el programa ImageJ® 1.43u (Rasband, 2018) sobre los registros fotográficos digitales tomados.

Los análisis con MEB y MET se realizaron en el Servicio de Microscopía Electrónica del Centro Científico Tecnológico Bahía Blanca (CCT-BB). En todos los casos se tomaron registros fotográficos.

3) Determinación de contenidos de polímeros estructurales, sustancias pécticas, polifenoles, taninos y cutinas.— Los tegumentos con grado 1, 2 y 3 de permeabilidad se obtuvieron siguiendo el procedimiento descrito para el análisis con MEB. En el caso de la colecta de los tegumentos de grado 2 y 3 se realizó un pool con los mismos de modo de lograr la cantidad necesaria para dicho estudio. Los procedimientos mencionados se realizaron hasta coleccionar un total de 1,5 g de tegumentos (aproximadamente 1.764 tegumentos), peso necesario para realizar las determinaciones analíticas por duplicado de 0,5 g por replica (600 tegumentos aproximadamente).

La determinación de polímeros estructurales de la pared celular, polifenoles totales y taninos condensados se realizó en el Instituto de Tecnología Celulósica (Facultad de Ingeniería Química, Universidad Nacional del Litoral, Santa Fe, Argentina). Las muestras de tegumentos fueron analizadas según los métodos citados en Van Soest (1994), que permitió calcular los porcentajes de celulosa, lignina, cutina, hemicelulosa, goma y mucilago; asimismo de contenidos celulares (Cc), que incluye: glucosa, fructosa, sacarosa, galactosa, almidón y fructosanos (protoplastos y sustancias pécticas). La determinación de polifenoles totales se realizó utilizando la técnica de Folin-Denis (Reicher *et al.*, 1981); mientras que para taninos condensados se utilizó el método de la vainillina (Broadhurst y Jones, 1978).

La asociación de los componentes químicos en función de la permeabilidad de los tegumentos, se efectuó a través de un análisis descriptivo según los resultados obtenidos.

Análisis Estadístico

El análisis de los datos de las medidas de longitud de las células para la comparación de los tegumentos de diferentes grados de permeabilidad, se realizó mediante la prueba estadística de comparación de media (Prueba t) con un 5% de nivel de significancia, usando el paquete estadístico Infostat (Di Rienzo *et al.*, 2017).

Para las sustancias químicas se calculó el desvío estándar de cada una para ambas repeticiones, las cuales eran de 0,5 g (600 tegumentos aproximadamente).

RESULTADOS

Estudio de los tegumentos seminales

1) Análisis morfológicos y anatómicos del tegumento seminal con microscopía electrónica de barrido (MEB).— En la superficie de las semilla de *D. incanum* de grado 1 (Fig. 1A) y grado 3 (Fig. 1B) de permeabilidad se distingue claramente el hilo (anillo y surco hilar), el micrópilo y la lente. En las semillas grado 1 se observó la sutura hilar abierta y un anillo hilar de menor desarrollo en comparación con

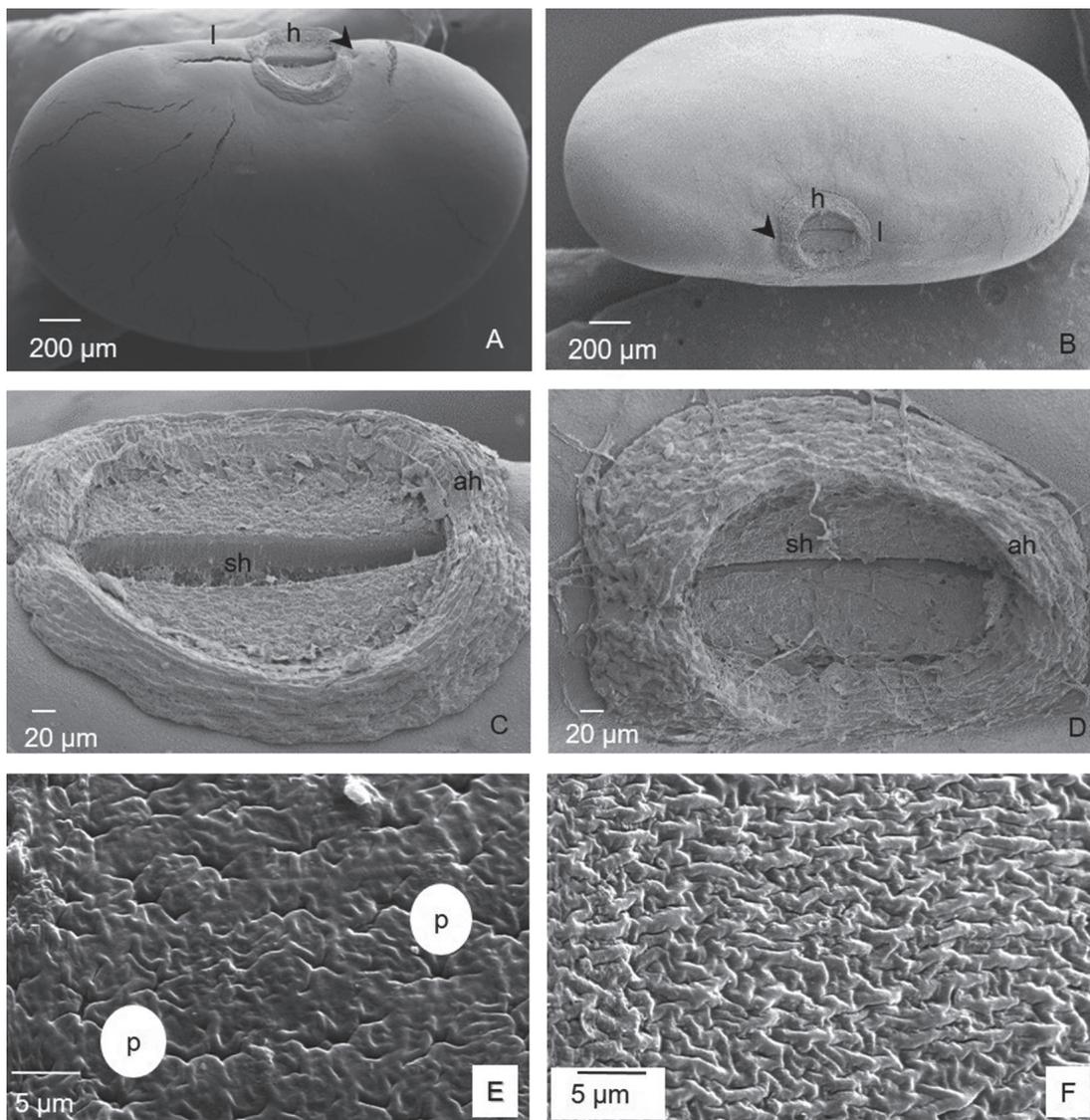


Fig. 1. *Desmodium incanum*. Exomorfología del tegumento seminal observada con MEB (microscopio electrónico de barrido). 1A, 1C y 1E) Tegumento seminal de semilla de grado 1. 1B, 1D y 1F) Tegumento de semilla de grado 3. 1A y 1B) Vista de la semilla. 1C y 1D) Vista superficial de la zona hilar, (ah) Anillo hilar, (sh) surco hilar. 1E y 1F) Vista superficial del tegumento seminal, (p) depresiones en la cutícula. Abreviaturas: cabeza de flecha, micrópilo; h, hilo; l, lente.

Fig. 1. *Desmodium incanum*. Seed coat exomorphology SEM view (scanning electron microscopy). 1A, 1C y 1E) Seed coat grade 1. 1B, 1D y 1F) Seed coat grade 3. 1A and 1B) seed view, (l) lens, (h) hilum, (arrow head) micropyle. 1C y 1D) Surface view of the hilar zone, (ah) hilar ring, (sh) hilar groove. 1E y 1F) Seed coat surface view, (p) cuticular pits.

las grado 3 (Figs. 1C y D). Los tegumentos seminales presentaron diferencias en el patrón de ornamentación según el grado de permeabilidad. En las semillas de grado 1, se observó la cutícula craquelada o finamente partida y un patrón rugulado ligeramente irregular con depresiones en la cutícula (Fig. 1E); mientras que en las de grado 3, el patrón se clasificó como rugulado con pliegues conspicuos (Fig. 1F).

En el corte transversal de tegumento seminal de semillas grado 1, se registró un grosor de $83 \pm 7 \mu\text{m}$ y en las de grado 3 de $91 \pm 8 \mu\text{m}$. Se observó una capa de macroesclereidas en empalizada, por debajo, una de osteoesclereidas correspondientes a la testa y luego un parénquima esponjoso de células planas.

En corte transversal se observa que las macroesclereidas, se disponen en un único estrato en empalizada (Fig. 2A-D). No se detectaron diferencias significativas en el largo ni en el ancho en las macroesclereidas (Tabla 1) entre las semillas de diferentes grados de permeabilidad estudiadas, sin embargo, en las semillas de grado 1 (Fig. 2E) se evidenció un mayor desarrollo de espacios intercelulares, en comparación con las de las semillas de grado 3 (Fig. 2F). En la zona de la lente, las macroesclereidas se presentan bi-estratras, con una disposición más laxa en las semillas de grado 1 (Fig. 2A) respecto de las de grado 3 (Fig. 2B). En ambos niveles de permeabilidad (grado 1 y 3) las osteoesclereidas no presentaron diferencias significativas respecto de sus dimensiones (Tabla 1) (Figs. 2C y D).

2) Pared celular de las macroesclereidas en cortes transversales con microscopio electrónico de transmisión (MET).— Las macroesclereidas se caracterizaron por mostrar contorno poligonal irregular (5-7 lados), de paredes anticlinales alargadas (Fig. 3), dispuestas en un único estrato en empalizada, con espacios intercelulares evidentes en semillas de grado 1 (Fig. 3A), en comparación con la compactación registrada en las semillas de grado 3 (Fig. 3B). En corte transversal, las macroesclereidas de grado 1 (Fig. 3A) evidenciaron contenido celular y una pared de grosor variable que osciló entre 0,8 a 7,9 μm . En tanto, las semillas de grado 3 (Fig. 3B) mostraron lumen celular y un grosor irregular de pared celular que varió entre 0,7 y 9,2 μm .

3) Determinación de contenidos de polímeros estructurales, sustancias pécticas, polifenoles, taninos y cutinas.— Los tegumentos de semillas de diferentes grados de permeabilidad presentaron los mismos componentes, sin embargo se registraron diferentes cantidades y baja variabilidad entre repeticiones (Tabla 2). Por un lado, las muestras con diferente permeabilidad evaluadas (grado 1 y muestra de tegumentos grado 2 y 3) mostraron igual porcentaje de polifenoles totales. Sin embargo, los tegumentos provenientes de semillas de grado 1 se caracterizaron por presentar un incremento del 96,6% de hemicelulosa (Hc) y del 81,3% de cutina (Cu), respecto a los valores determinados para las muestras de los tegumentos provenientes de semillas de grado 2 y 3 de permeabilidad, mientras que estos últimos se caracterizaron por mostrar una mayor cantidad de taninos condensados (Tc), sustancias pécticas (Cc), celulosa (C) y lignina (L).

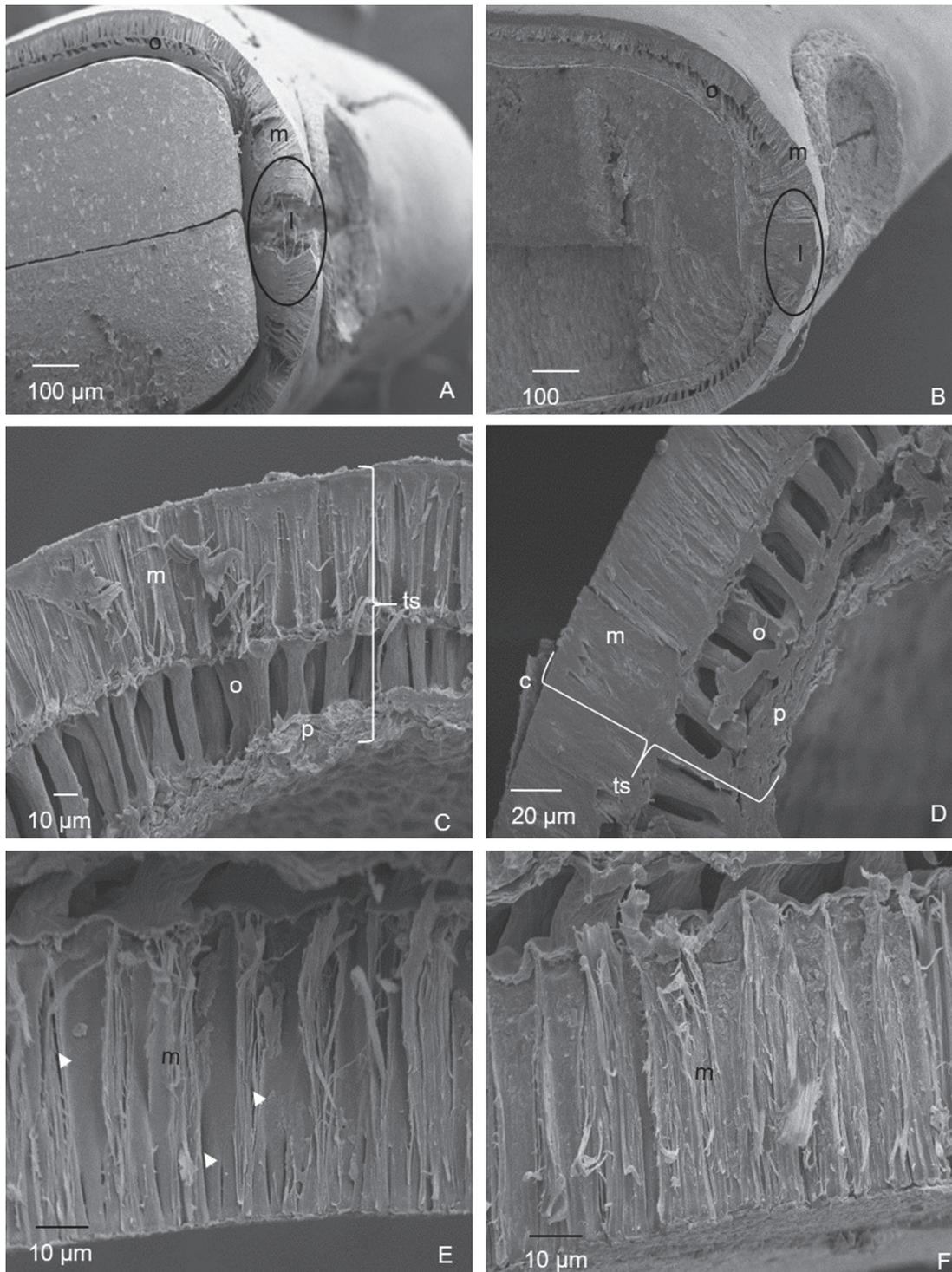


Fig. 2. *Desmodium incanum*. Corte transversal de tegumento seminal observado con MEB (microscopio electrónico de barrido). 2A, 2C y 2E) Tegumento grado 1. 2B, 2D y 2F) Tegumento grado 3. 2A y 2B) Corte transversal de semilla. (l) lente, (o) osteoesclereidas. 2C y 2D) Vista de tegumento seminal, (c) cutícula que se desprende, (m) macroesclereidas, (o) osteoesclereidas, (p) parénquima, (ts) tegumento seminal. 2E y 2F) Vista en detalle de macroesclereidas (flecha) separación entre células.

Fig. 2. *Desmodium incanum*. Seed coat cross-section SEM view (scanning electron microscopy). 2A, 2C y 2E) Tegument grade 1. 2B, 2D y 2F) Tegument grade 3. 2A y 2B) Seed cross-section. (l) les, (O) osteosclereids. 2C y 2D) Seed coat view, (m) Macroscleireids, (o) Osteosclereids, (p) Parenchyma, (ts) seed coat. 2E y 2F) Detail view of macroscleireids (arrow) gap between cells.

Tabla 1. Dimensiones de macroesclereidas y osteoesclereidas en tegumento seminal con diferente permeabilidad de semillas de *Desmodium incanum*.

Table 1. Macrosclereids and osteosclereids dimensions of *Desmodium incanum* seed coats with different seed permeability.

Tegumento seminal	Macroesclereidas (μm)		Osteoesclereidas (μm)	
	Largo	Ancho	Largo	Ancho
Grado 1	43,0 \pm 1,9 a	11,1 \pm 2,0 a	26,2 \pm 4,9 a	8,2 \pm 1,4 a
Grado 3	43,3 \pm 2,7 a	10,0 \pm 1,9 a	28,0 \pm 3,3 a	8,0 \pm 1,0 a

Los resultados se expresan en $\mu\text{m} \pm$ desvío estándar y responden a valores promedios de 4 células en la testa del tegumento de tres semillas para cada nivel de permeabilidad. Medias con letras iguales en columnas no son significativamente diferentes ($P > 0,05$).

Tabla 2. Determinación de componentes orgánicos (%) en materia seca de tegumentos de diferente permeabilidad de semillas de *Desmodium incanum*.

Table 2. Determination of organic components (%) in dry matter of *Desmodium incanum* seed coats with different permeability.

Tegumento seminal	Componentes orgánicos								
	Pt	Tc	Cc	Pc	Pc		FAD		
					FAF+Si	Hc	C	L	Cu
Grado 1	0,8 \pm 0,1	1,6 \pm 0,0	9,7 \pm 0,3	90,3 \pm 0,1	44,1 \pm 0,2	46,2 \pm 0,1	30,9 \pm 0,1	0,4 \pm 0,0	13,6 \pm 0,0
Grados 2 y 3	0,8 \pm 0,1	2,3 \pm 0,1	15,1 \pm 0,2	84,9 \pm 0,1	61,4 \pm 0,0	23,5 \pm 0,1	53,5 \pm 0,0	0,5 \pm 0,0	7,5 \pm 0,0

Los resultados se expresan en % \pm desvío estándar. (Pt) Polifenoles totales; (Tc) Taninos condensados; (Cc) Contenido celular: glucosa, fructosa, sacarosa, galactosa, almidón y fructosanos (protoplastos y sustancias pécticas); (Pc) Pared Celular: (Hc) hemicelulosa, gomas, mucílagos, (C) celulosa, (L) lignina, (Cu) cutina; (FAD) Fibra ácido detergente: celulosa, lignina, cutina y sílice.

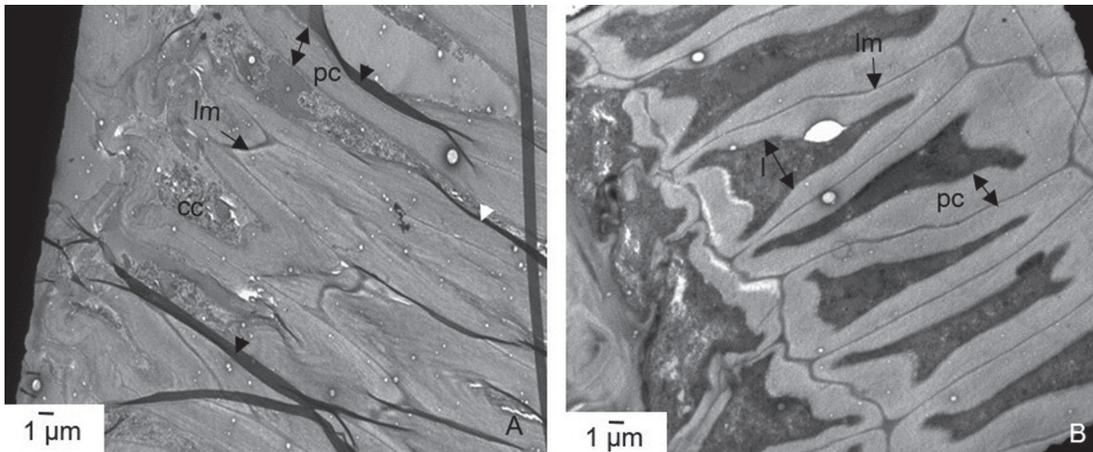


Fig. 3. *Desmodium incanum*. Corte transversal de macroesclereidas de tegumento seminal observada con MET (microscopio electrónico de transmisión). A) Grado 1. B) Grado 3. (cabeza de flecha) separación entre células, (cc) contenido celular (l) lumen, (lm) laminilla media, (pc) pared celular.

Fig. 3. *Desmodium incanum*. Cross section of the seed coat macrosclereids TEM view (transmission electron microscopy). A) Grade 1. B) Grade 3. (arrow head) gap between cells, (cc) cellular content (l) lumen, (lm) middle lamella, (pc) cell wall.

DISCUSIÓN

La distribución de estratos celulares del tegumento seminal (macroesclereidas, osteoesclereidas y parenquimáticas) halladas coinciden con lo mencionado por Esau (1987) y Cortés (1980) para las fabáceas. Específicamente en *Desmodium motorium* (Houtt.) Merr. se determinó que la semilla proviene de un óvulo bitegmico (Unnisa *et al.*, 1994) por lo cual el estrato más interno (células parenquimáticas) podría corresponder al tegmen, aunque para la determinación precisa se requiere realizar un estudio ontogenético.

Lersten (1981) define patrones topográficos en leguminosas papilinoideas, de estos el patrón hallado en este estudio para *D. incanum* resultó ser rugulado, pero se evidenciaron diferencias en el patrón de ornamentación cuticular del tegumento seminal entre grados, siendo rugulado ligeramente irregular con depresiones en la cutícula para el grado 1 y rugulado con pliegues conspicuos para el grado 3. Estos resultados concuerdan con los caracteres de semillas de *Medicago sativa* L. y *Trifolium repens* L. para ambos grados de dormición (Galussi *et al.*, 2013a, 2013b, 2015). Las cantidades de ceras y cutina detectadas en los tegumentos se asocian al impedimento al ingreso de agua, alterando la velocidad de hidratación (Van Staden *et al.*, 1989; Ferrer Amorós, 1997).

El grosor del tegumento seminal varió entre 83 y 91 μm en las semillas de los grados 1 y 3 de permeabilidad respectivamente y es conferido principalmente por el tamaño de las macroesclereidas y osteoesclereidas. Estos valores son mayores a los encontrados en tegumentos seminales de forrajeras de leguminosas cultivadas como *Trifolium repens* L. y *Medicago sativa* L. (Galussi *et al.*, 2019). La profundidad de dormición de *D. incanum* es mayor y en mayor cantidad de semillas, lo cual se diferencia en distintos niveles de dormición entre las especies mencionadas anteriormente, aunque se debe contemplar también los tipos de sustancias químicas presentes.

En cuanto a la entrada de agua, Baskin y Baskin (2000) mencionan que la ruptura de la dormición en muchas especies con dormición física se daría por la formación de una apertura especializada en la estructura anatómica del tegumento seminal, a través de la cual entra el agua y se hidrata el embrión, que en el caso de las Fabaceae sería a través del lente o estrofiolo. De forma similar, para *D. incanum*, Gillij *et al.* (2023) observaron que la entrada de agua se inició por la zona de la lente en semillas de distintos grados de dormición física. Esto indica que las características anatómicas (macroesclereidas bi-estratras, con una disposición más laxa) halladas en la zona de la lente podrían ser uno de los aspectos determinantes para la permeabilidad del agua, además la compacta empalizada de macroesclereidas y sustancias químicas halladas en el resto del tegumento seminal aseveran este ingreso por la zona antes mencionada, ya que impiden la entrada de agua.

Los valores de celulosa registrados (30,9% y 53,5%) para el grado 1 y para la muestra grado 2 y 3 respectivamente, incluyen tanto a los de pared primaria como secundaria, y estarían dentro de los rangos generales mencionados para los vegetales (Salisbury y Ross, 1992; Taiz y Zeiger, 1998). Sin embargo, la cantidad de hemicelulosa conjuntamente con gomas y mucilago (46,2%) hallada en tegumentos del grado 1 fue mayor que la mencionada por dichos autores. Dicho componente es caracterís-

tico principalmente de la pared primaria de la célula (Ferrer Amorós, 1997), es un polímero hidrófilo abundante (Jie *et al.*, 2021), pero según la combinación con otras sustancias podría pasar a tener un carácter hidrófobo (Farhat *et al.*, 2017). Funcionan como almacén de sustancias de reserva, además realizan funciones reguladoras, estructurales y de control de la expansión celular (Siota, 2014).

Para lignina los valores entre grado 1 y la muestra grado 2 y 3 de permeabilidad fueron de 0,4 y 0,5 %, respectivamente, y resultan menores que los señalados en semillas de *Glycine max* (L.) Merr., *M. sativa* y *T. repens* (Baciu-Miclaus, 1970; Faner, 2007; Galussi *et al.*, 2015, 2019). La lignina confiere mayor dureza al tegumento seminal, por ser un componente cementante que mantiene unidas las fibras de celulosa, proporcionando también mayor rigidez. Además, brinda impermeabilidad al agua al ser un componente hidrófobo (Ferrer Amorós, 1997; Capeleti *et al.*, 2005; Sandoval, 2005). Esau (1987) menciona que el endurecimiento del tegumento seminal en leguminosas se da por la formación de paredes secundarias muy lignificadas en las macrosclereidas alargadas y la presencia de osteosclereidas. Barros *et al.* (2015) señala que la lignificación de una célula puede darse de forma cooperativa. Este hecho permitiría entender las diferencias en la compactación de la empalizada y los espesores de pared celular en las macrosclereidas de tegumentos pertenecientes a semillas de grado 1 y grado 3, con distintos contenidos de lignina que confiere diferente permeabilidad al agua.

Según, Bewley y Black (1986) las semillas acumulan importantes cantidades de fenoles en sus tegumentos seminales que actúan como un filtro para que el oxígeno no llegue al embrión, inhibiendo su germinación. Estos compuestos presentan actividad antioxidante al proteger el organismo de los radicales libres, moléculas altamente reactivas que pueden dañar el organismo a nivel celular, y pueden proteger plantas y semillas contra enfermedades, depredadores y estrés abiótico, o apoyar sus interacciones con organismos beneficiosos o simbióticos (Padilla *et al.*, 2008; Corso *et al.*, 2020). En el caso de los tegumentos de *D. incanum*, el contenido de polifenoles totales no presentó diferencias significativas en las semillas de los diferentes grados de imbibición estudiadas.

Por otro lado, los taninos tienen la propiedad de desnaturalizar las proteínas, con lo cual son altamente astringentes, confirmando la característica impermeable a las semillas (Zavaleta *et al.*, 2003). Además, fortalecen mecánicamente las paredes celulares, como agentes antimicrobianos, en la defensa contra herbívoros, entre otros. Pueden actuar como antioxidantes y, por tanto, limitar la difusión de oxígeno en la cubierta de la semilla (Harborne y Williams, 2000; Pietta, 2000; Debeaujon *et al.*, 2007; Pourcel *et al.*, 2007). Según Demonsais *et al.* (2020) en *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. la pared celular tánica hace que la cubierta de la semilla sea menos permeable a los compuestos externos. En los tegumentos seminales analizados, los taninos condensados se presentaron en mayor proporción (2,3%) en tegumentos de semillas de grado 2 y 3 comparada con las de grado 1 (1,6%), por lo que puede ser un componente determinante en el contenido de agua de la semilla, la cantidad y profundidad de la dureza, aspectos que protegen la viabilidad de las mismas.

La variabilidad de los caracteres morfoanatómicos y componentes químicos de los tegumentos se ve reflejada en los niveles de permeabilidad al agua hallados en

las semillas. Esta variabilidad, puede entenderse según lo mencionado por Quinlivan (1971) al sostener que al momento de la formación de la semilla en la planta madre no todas las semillas se encuentran sometidas a las mismas condiciones ambientales. Los estudios de la floración en esta especie indicaron que la misma se completa entre 10 y 13 días y finaliza la madurez entre los 22 y 32 días (Gillij *et al.*, 2021). En algunas especies ya sea el estrés hídrico, la humedad relativa, la temperatura, pueden inducir la formación de semillas duras (Nikolaeva, 1980; Besnier Romero, 1989; Harper, 1991; Baskin y Baskin, 2004). Por, lo cual se, puede entender el elevado porcentaje de semillas duras hallado, considerando que la especie es de característica subtropical de veranos cálidos (Baseggio *et al.*, 1998; Peters *et al.*, 2010). Por esto, es probable que alguno de los factores climáticos en interacción con el genotipo durante el periodo de fructificación y embriogénesis, hayan inducido los diferentes niveles de dormición física de las mismas.

Se plantea la conveniencia de estudiar la interacción entre los genotipos poblacionales y diferentes condiciones ambientales de producción, sea en campo o invernadero, a fin de conocer los factores determinantes de la dureza física.

Además, otra posible línea investigativa podría considerar indagar la ubicación específica de las sustancias químicas en los estratos celulares de los tegumentos seminales de distintas especies con semillas duras y sus implicancias en los grados de permeabilidad al agua.

CONCLUSIÓN

Se puso en evidencia que los diferentes niveles de permeabilidad al agua en semillas de *D. incanum* se asocian con las características morfoanatómicas y a las proporciones de los componentes químicos de los tegumentos seminales. Las diferencias observadas entre tegumentos de distintos grados de permeabilidad al agua se encontraron en: la ornamentación, la estructura anatómica de la lente, la compactación de la empalizada, el grosor de la pared celular en las macroesclereidas. Así como, en las proporciones de sustancias químicas como FAD+S, celulosa, lignina, ceras, taninos condensados, que ocasionan diferentes grados de impermeabilidad del tegumento. Aspectos que reflejan niveles de dormición física de las semillas y contribuyen a preservar la viabilidad de los embriones.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo se realizó con los aportes del proyecto de investigación y desarrollo PID UNER n° 2200. Gracias a la Dra. Graciela Viviana Olmos y a la Mg. María Claudia Taleb, del Instituto de Tecnología Celulósica (Facultad de Ingeniería Química, Universidad Nacional del Litoral, Santa Fe, Argentina).

CONFLICTOS DE INTERÉS

Ninguno de los autores presenta conflicto de intereses.

BIBLIOGRAFÍA

- Aniszewski, T. (2009). *Phaseolus lunatus* testa topography and biometrics of crushed cells. *Seed Science and Technology* 37: 121-131.
- Baciu-Miclaus, D. (1970). Contribution to the study of hard seed and coat structure properties of soybean. Proceeding International. *Seed Testing Association* 35: 599-617.
- Barros, J., Serk, H., Granlundz, I. y Pesquet, E. (2015). The cell biology of lignification in higher plants. *Annals of botany* 115: 1053-1074.
- Baseggio, J., Brandão Franke, L. y Nabinger, C. (1998). Dinâmica do florescimento e produção de sementes de *Desmodium incanum* DC. *Revista Brasileira de Sementes* 20 (2): 118 -124.
- Baskin, J. M. y Baskin, C. C. (2000). Taxonomy, ecology, and evolution of physical dormancy in seeds. *Plant Species Biology* 15: 139-152.
- Baskin, J. M. y Baskin, C. C. (2004). A classification system for seed dormancy. *Seed Science Research* 14: 1-6.
- Besnier Romero, F. (1989). Semillas Biología y Tecnología. Ed. *Mundiprensa*, Madrid. 637 p.
- Bewly, J. y Black, M. (1986). Seeds. Physiology of Development and Germination. New York. Ed. Pleum Press. Vol 2, pp. 182.
- Broadhurst, R. B. y Jones, W. T. (1978). Analysis of condensed tannins using acidified vanillin. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 32: 788-794.
- Capeleti, I., Ferrarese, M. L., Krzyzanowski, F. y Ferrarese, F. (2005). A new procedure for quantification of lignin in soybean (*Glycine max* (L.) Merrill) seed coat and their relationship with the resistance to mechanical damage. *Seed Science and Technology* 33: 511-515.
- Carámbula, M. (1977). Producción y manejo de pasturas sembradas. Montevideo, Ed. *Hemisferio Sur*. pp. 106-116.
- Côme, D. y Courbineau, F. (1992). Environmental control of seed dormancy and germination. En: Fu Jiarui and Khan A.A. (Eds.). *Advances in the Science and Technology of Seeds* (pp. 277-298). Science Press, Beijing, New York.
- Corso, M., Perreau, F., Mouille, G. y Lepiniec, L. (2020). Specialized phenolic compounds in seeds: Structures, functions, and regulations. *Plant Science* 296: 110471. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2020.110471>
- Cortés, F. (1980). Histología vegetal básica. H. Blume Ediciones. Madrid. 128 p.
- Debeaujon, I., Lepiniec, L., Pourcel, L., y Routaboul, J. M. (2007). Seed Coat Development and Dormancy. In *Annual Plant Reviews Volume 27: Seed Development, Dormancy and Germination* (John Wiley & Sons, Ltd), pp. 25-49.
- Demonsais, L., Utz-Pugin, A., Loubery, S. y Lopez-Molina, L. (2020). Identification of tannic cell walls at the outer surface of the endosperm upon Arabidopsis

- seed coat rupture. *The Plant Journal* 104 (3): 567-580. <https://doi.org/10.1111/tpj.14994>
- Di Rienzo, J. A., Casanoves, F., Balzarini, M.G., Gonzalez, L., Tablada, M. y Robledo, C.W. (2017). InfoStat versión 2017. Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina. <http://www.infostat.com.ar>
- Esau, K. (1987). Anatomía de las plantas con semillas. Ed. *Hemisferio Sur*. Buenos Aires, Argentina. 512 p.
- Faner, C. (2007). La pastura de alfalfa como fuente de alimentación para cerdos en crecimiento y terminación Boletín AACV 01.10.07. www.produccion-animal.com.ar/produccion_porcina/72-alfalfa
- Farhat, W., Venditti, R. A., Hubbe, M., Taha, M., Becquart, F. y Ayoub, A. (2017). Una revisión de materiales a base de hemicelulosa resistentes al agua: procesamiento y aplicaciones. *Chemistry-Sustainability-Energy-Materials* 10 (2): 305-327. <https://doi.org/10.1002/cssc.201601047>
- Fernández, J. G., Benítez, C. A., Pizzio, R. M. y Royo-Pallares, O. (1988). Leguminosas forrajeras nativas del este de la provincia de Corrientes. Corrientes, Argentina: INTA-EEA.
- Ferrer Amorós, J. (1997). Las células de los tejidos vegetales. Ed. Vedral, S.L., Barcelona, España. 392 p.
- Galíndez, G., Ceccato, D., Malagrina, G., Pidal, B.; Chilo, G., Bach, H., Fortunato, R. y Ortega-Baes, P. (2016). Latencia física de semillas en especies de leguminosas nativas de Argentina. Boletín de la Sociedad Argentina de Botánica 51 (1): 73-78. <https://doi.org/10.31055/1851.2372.v51.n1.14370>
- Galussi, A. A., Moya, M. E., Zuriaga, F. D., Zimmermann, L. R. y Basso R. (2013a). Effect of the dormancy mechanism on seed quality of 'NK Churrinche' white clover (*Trifolium repens*). *Seed Science and Technology* 35 (2): 199-211.
- Galussi, A. A., Argüello, J. A., Moya, M. E., Zuriaga, F. D. y Zimmermann, L. R. (2013b). Seed dormancy mechanism as a factor influencing seed physiological quality in alfalfa (*Medicago sativa*) cv. Baralfa 85. *Seed Science and Technology* 41 (1):50-59. <https://doi.org/10.15258/SST.2013.41.1.05>
- Galussi, A. A., Argüello, J. A., Cerana, M. M., Maximino, M. G. y Moya, M. E. (2015). Características anatómicas y químicas del tegumento seminal de *Medicago sativa* L. (alfalfa) cv. Baralfa 85 y su asociación con la dormición. *Phyton* 84 (1): 163-175. http://www.scielo.org.ar/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1851-56572015000100023&lng=es&tlng=es
- Galussi, A. A., Moya, M. E., Zuriaga, F. D. y Zimmermann, L. R. (2019). Seed physical dormancy of two cultivars of alfalfa (*Medicago sativa*) and white clover (*Trifolium repens*): similarities and differences. In: R. V. Botelho, ed. *Plant dormancy. Mechanisms, causes and effects*. (pp. 173-201). New York: Nova Science Publishers.
- Gillij, Y. G., Galussi, A. A., Prand, M. F. y Perissé, P. (2021). Calidad y dormición física de semillas de *Desmodium incanum* DC. en la provincia de Entre Ríos, Arentina. *Pastos y Forrajes* 44, eE02.
- Gillij, Y. G., Marchese, F. G. y Galussi, A. A. (2023). *Desmodium incanum*: entrada del agua al embrión por tinción. Resumen XXXIX Jornadas Argentinas de Botánica. Catamarca.

- Harborne, J. B. y Williams, C. A. (2000). Advances in flavonoid research since 1992. *Phytochemistry* 55: 481-504.
- Harper, L. W. (1991). The effect of harvesting and conditioning on seed dormancy. *Seed Technologist News* 65 (2): 50-55.
- INTA (Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria) – EEA (Estación Experimental Agropecuaria). Informe meteorológico mensual. Paraná. 2017-2020.
- ISTA (International Rules for Seed Testing). (2016). Bassersdorf, Switzerland: International Seed Testing Association.
- Jie, Ch., Xiaoyue, J., Jinxiu, F., Jingyi, Z., Binzhen, Z. y Kefan, Z. (2021). Extracción de hemicelulosa y preparación de hidrogel sensible a la temperatura. *Nuevos Materiales Químicos* 49 (2): 214-217. <https://www.hgxx.org/EN/Y2021/V49/I2/214>
- Lersten, N. R. (1981). Testa Topography in Leguminosae, Subfamily Papilionoideae. *Proceedings of the Iowa Academy of Science* 88 (4): 180-191. <https://scholarworks.uni.edu/pias/vol88/iss4/10>
- Moreira de Carvalho, N. y Nakagawa, J. (1988). Semillas. Ciencia, Tecnología y Producción. Ed. Hemisferio Sur, R.O. del Uruguay. 406 p.
- Nikolaeva, M. G. (1980). Factors controlling the seed dormancy pattern. En: Elsevier/North-Holland Biomedical Press (Eds.), (pp. 51-74). The physiology and biochemistry of seed dormancy and germination. Amsterdam, The Netherlands.
- Orsenigo, S., Mondoni, A., Tazzari, E. R., Vagge, I., Rossi, G. y Abeli, T. (2019). Seed dormancy and seedling growth changes in response to scarification treatments and population origin in *Kosteletzkya pentacarpos* (Malvaceae). *Seed Science and Technology* 47 (1): 59-64. <https://doi.org/10.15258/sst.2019.47.1.07>
- Padilla, F. C., Rincón, A. M. y Bou-Rached, L. (2008). Contenido de polifenoles y actividad antioxidante de varias semillas y nueces. *Archivos latinoamericanos de nutrición* 58 (3): 303-308.
- Paul, D., Chakrabarty, S. K., Dikshit, H. K. y Jha, S. K. (2019). Hardness breaking force: an alternative method to evaluate hardseededness in mung bean (*Vigna radiata*). *Seed Science and Technology* 47 (2): 155-160. <https://doi.org/10.15258/sst.2019.47.2.04>
- Pérez-García, F. (2008). Effect of cryopreservation, gibberellic acid and mechanical scarification on the seed germination of eight endemic species from the Canary Islands. *Seed Science and Technology* 36: 237-242.
- Peters, M., Franco, L. H., Schmidt, A. y Hincapié, B. (2010). Especies forrajeras multipropósito. Opciones para productores del Trópico Americano. CIAT-Cali. P. 212.
- Pietta, P. G. (2000). Flavonoids as Antioxidants. *Journal of Natural Products* 63: 1035-1042.
- Popinigis, F. (1985). Fisiología da Semente [Seed physiology], Ed. Pax, DF, Brasília. 289 p.
- Pourcel, L., Routaboul, J. M., Cheynier, V., Lepiniec, L. y Debeaujon, I. (2007). Flavonoid oxidation in plants: from biochemical properties to physiological functions. *Trends in Plant Science* 12: 29-36.
- Quinlivan, B. J. (1971). Seed coat impermeability in legumes. *The Journal of the Australian Institute of Agricultural Science* 37: 283-295.

- Rasband, W. S. (2018). ImageJ, Institutos Nacionales de Salud de EE. UU., Bethesda, Maryland, EE.UU., pp 1997-2018. <https://imagej.nih.gov/ij/>
- Reicher, F., Sierakowski, M. R., Correa, J. B. C. (1981). Spectrophotometric determination of tannins by phosphotungstic-phosphomolibdic reagent. *Brazilian Archives of Biology and Technology* 24 (4): 407-411.
- Salisbury, F. B. y Ross, C. W. (1992). Fisiología de las plantas. Células: agua, soluciones y superficies. Ed. Thomson, Spain Paraninfo S.A., Madrid, España, 305 p.
- Sandoval, Z. E. (2005). Técnicas aplicadas al estudio de la anatomía vegetal. Universidad Nacional Autónoma de México. Cuadernos, (pp 38-51), DF, México.
- Scandaliaris, M., Molinelli, M. L., Lovey, R. J., Perissé, P., Perez, V. M. y Arias, C. V. (2013). Caracterización morfoanatómica de fruto, semilla y plántula de *Desmodium incanum* DC. (Fabaceae: Faboideae: Desmodieae). *Arnaldoa*. 20 (1): 45-58. <https://doi.org/10.22497/134>
- Siota, S. R. (2014). Valorización de hemicelulosas de biomasa vegetal. (tesis Doctoral), Universidad de Vigo, España.
- Sorrivas, V. de Lozano y Morales, A. (1986). Introducción a la Microscopía Electrónica. Ed. CRIBABB, Bahía Blanca, Argentina, 220 p.
- Spurr, A. M. (1969). A low-viscosity epoxy embedding medium for electron microscopy. *Journal of Ultrastructure Research* 26: 31-43.
- Taiz, L. y Zeiger, E. (1998). Plant physiology. 2ª ed. Sinauer Associates, Inc. Massachusetts. 792 p.
- Unnisa, A., Febulaus, G. N. V. y Pullaiah, T. (1994). Una contribución a la embriología de *Desmodium motorium* (Houtt.) Merr. (= *D. gyrans* (Lf) DC.) (Fabaceae). *Giornale botanico italiano* 128 (5): 833-838. <https://doi.org/10.1080/11263509409430306>
- Van Assche, J. A., Debucquoy, K. L. A., Rommens, W. A. F. (2003). Ciclos estacionales en la capacidad de la germinación de las semillas enterradas de algunas leguminosas (Fabaceae). *New Phytologist* 158 (2): 315-323.
- Van Soest, P. J. (1994). Nutritional Ecology of the Ruminant. Ed. Cornell University Press. Ithaca, NY, USA. 476 p.
- Van Staden, J., Manning, J. C., Kelly, K. M., Stirton, C. H. y Zarucchi, J. L. (1989). Advances in legume biology. *Monographs of Systematic Botany* 29: 417-450.
- Yassen, M. Y., Barringer S. A., Splittstoesser, W. E. y Constanza, S. (1994). The role of seed coat in seed viability. *The Botanical Review* 60: 426-439.
- Zavaleta, H., Hernández, M., Cuevas, J. y Engleman, M. (2003). Anatomía de la semilla de *cupania dentata* (Sopindaceae) con énfasis en la semilla madura. *Anales del Instituto de Biología. Serie Botánica* 74(1): 17-29.
- Zeng, L. W., Cocks, P. S., Kailis, S. G. y Kuo, J. (2005). Structure of the seed coat and its relationship to seed softening in Mediterranean annual legumes. *Seed Science and Technology* 33: 351-362.
- Zimmermann, L. R., Galussi, A. A., Martinelli, A. H. M., Fernández, A. P., García, A. H.; Pitter, J. R., Zecchin, A. R. y Dechanzi, D. I. (1998). Hard seed viability in *Medicago sativa* L., *Lotus corniculatus* L., *Trifolium repens* L., *T. pratense* L. and *Melilotus alba* Med. *Seed Science and Technology* 26: 271-273.