

RESPUESTA DEL VIGOR DE PLÁNTULA DE POBLACIONES DE *Lotus tenuis* A VARIACIONES CONTRASTANTES DE DISPONIBILIDAD DE AGUA, LUZ Y NUTRIENTES

SEEDLING VIGOR RESPONSE OF *Lotus tenuis* POPULATIONS TO CONTRASTING VARIATIONS OF WATER, LIGHT AND NUTRIENT AVAILABILITY

V. Yanet Ixtaina¹, M. Merced Mujica^{1,2}

¹Universidad Nacional de La Plata. Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales, La Plata, Buenos Aires, Argentina. (vanesaix@hotmail.com). ²Dirección de Tecnología y Experimentación. Ministerio de Asuntos Agrarios de la Provincia de Buenos Aires. (mmujica@ciudad.com.ar).

RESUMEN

La intersejembra de *Lotus tenuis*, leguminosa estratégica para mejorar el pastizal, es limitada por la escasa habilidad competitiva de sus plántulas. En este artículo se evaluó la influencia de variaciones de agua, luz y nutrientes sobre caracteres involucrados con la implantación de poblaciones de *L. tenuis*: peso seco aéreo (PSa), número de tallos en la corona (Nt), longitud del tallo principal (Lt) y número de hojas desplegadas en el tallo principal (Nh), en siete poblaciones (P) sometidas a situaciones contrastantes de disponibilidad de agua (A), fertilizante (F) y luz (S). Se encontró efecto de P para PSa; la A y S afectaron todos los caracteres; no hubo efecto de F; el aumento de PSa, Lt y Nh, en condiciones de anegamiento, evidenció un comportamiento tolerante, lo cual puede ser una ventaja competitiva con respecto a otras especies en estas condiciones; el sombreado redujo PSa, Nt y Nh, y promovió una mayor Lt. Se destaca la interacción A × S ($p \leq 0.001$) para Lt y PSa; el mayor PSa de las plántulas sometidas a anegamiento y sin restricción lumínica, puede explicarse por un efecto benéfico de la abundancia de agua, que evitó un posible estrés hídrico temporarios. Se detectó variación entre poblaciones sólo para PSa y ausencia de variación significativa para los otros caracteres evaluados, lo que limitó las expectativas de respuesta a la selección a nivel interpoblacional. El vigor de las plántulas resultó condicionado por la A y S, lo cual debe considerarse en la planificación de la siembra. Hubo interacción P × S ($p \leq 0.05$) para Nt y P × F × S ($p \leq 0.01$) para Lt, aunque no se detectó interacción poblaciones × ambientes para el vigor de las plántulas evaluado por PSa ni para Nh.

ABSTRACT

The intercrop of *Lotus tenuis*, a strategic legume to improve pasture, is constrained by the limited competitive ability of its seedlings. In this article we evaluated the influence of the environmental variations of water, light and nutrients on the characters involved in the implantation of populations of *L. tenuis*: air dry weight (PSA), number of stems in the crown (Nt), main stem length (Lt) and number of leaves unfolded on the main stem (Nh), in seven populations (P) under contrasting situations of water availability (A), fertilizer (F) and light (S). An effect of P on PSA was detected; the A and S affected all characters; F was found to have no effect; increasing PSA, Lt and Nh in flooding conditions showed a tolerant behavior, which can be a competitive advantage over other species under these conditions; shading reduced PSA, Nt and Nh, and promoted greater Lt. The interaction A × S ($p \leq 0.001$) for Lt and PSA was outstanding; the higher PSA of seedlings subjected to flooding and unrestricted light can be explained by the beneficial effect of abundant water, which prevented potential temporary water stress. Variation among populations was detected only for PSA and there was no significant change in the rest of the characters evaluated, thus limiting the expected response to selection at the interpopulation level. The strength of seedlings was determined by A and S, which should be taken into account in sowing planning. There was interaction P × S ($p \leq 0.05$) for Nt and P × F × S ($p \leq 0.01$) for Lt, although no populations × environments interaction was detected for the seedling vigor estimated by PSA nor for Nh.

* Autor responsable ♦ Author for correspondence.

Recibido: Julio, 2008. Aprobado: Septiembre, 2009.

Publicado como ARTÍCULO en *Agrociencia* 44: 31-41. 2010.

Keywords: *Lotus tenuis* Waldst et Kit, flooding, fertilization, shading, seedling vigor.

Palabras clave: *Lotus tenuis* Waldst et Kit, anegamiento, fertilización, sombreado, vigor de plántula.

INTRODUCCIÓN

La especie forrajera *Lotus tenuis* Waldst et Kit (ex *Lotus glaber* Mill) es una leguminosa perenne, alógama, naturalizada en la Pampa Deprimida Bonaerense (Provincia de Buenos Aires, Argentina). Esta región se caracteriza por presentar ciclos alternados de inundación y sequía, con suelos muy heterogéneos con baja infiltración, exceso de salinidad, alcalinidad por sodio y una capa freática elevada (Tricart, 1973). La principal actividad productiva en la región es la cría de ganado vacuno basada principalmente en los pastizales como único recurso forrajero (Insausti y Quinos, 2000). *L. tenuis*, por su adaptación a las condiciones limitantes de clima y suelo mencionadas, y por aportar proteína de alta digestibilidad (McGraw *et al.*, 1989), sería estratégica para mejorar la productividad y calidad de los pastizales de la región, escasos en leguminosas. Quinos *et al.* (1998) han atribuido a *L. tenuis* la función de especie clave en el manejo de los pastizales, basándose en el efecto positivo de la presencia cercana de esta especie en el crecimiento de *Paspalum dilatatum*, debido al aumento de la disponibilidad edáfica de N provocada por la fijación simbiótica bacteriana y la baja demanda del N disponible en el suelo por *L. tenuis*.

El uso de *L. tenuis* como mejoradora de pastizales implica su implantación por intersembra, limitada por la escasa habilidad competitiva de las plántulas. La comunidad vegetal donde se practica la intersembra de esta especie es un factor condicionante del éxito (Miñón y Colabelli, 1993). Un aporte a la solución de la problemática de la implantación de *L. tenuis* es la mejora genética del vigor de las plántulas. Se encontró una correlación positiva entre el peso de la semilla y el vigor de las plántulas (Beuselinck y McGraw, 1983; Collado y Mujica, 2002). Asimismo, se determinó la función e importancia de los cotiledones en la etapa inicial del crecimiento (Mujica y Rumi, 1998), mientras que un análisis de regresión múltiple aplicado a 20 progenies de policruza al azar indicó que 43 % del vigor de las plántulas fue determinado por el peso de la semilla y la superficie de los cotiledones (Collado y Mujica, 2002). Sasal *et al.* (2001) informaron, para

INTRODUCTION

The forage species *Lotus tenuis* Waldst et Kit (ex *Lotus glaber* Mill) is a perennial allogamous leguminous ative naturalized of the Pampa Deprimida Bonaerense (Province of Buenos Aires, Argentina). This region is characterized by presenting alternate cycles of flood and drought, very heterogeneous soils showing low infiltration, excessive salinity, alkalinity by sodium and a high water table (Tricart, 1973). The main activity in the region is raising cattle based mostly on pastures as the only forage resource (Insausti and Quinos, 2000). *L. tenuis*, because of its adaptation to climate restricting conditions and soil mentioned, and for providing highly digestible protein (McGraw *et al.*, 1989), would be strategic to improve productivity and quality of grasslands in the region, scarce in legumes. Quinos *et al.* (1998) have attributed to *L. tenuis* the role of key species in the management of grasslands, on the basis of the positive effect of the nearby presence of this species on the growth of *Paspalum dilatatum*, due to increased soil N availability caused by the symbiotic bacteria fixation and the low demand of N available in the soil by *L. tenuis*.

The use of *L. tenuis* to improve grasslands involves its implantation during intercrop, limited by the low competitive ability of seedlings. The plant community in which the intercrop of this species is practiced is a determinant factor of success (Miñón and Colabelli, 1993). A contribution to solving the problem of introduction of *L. tenuis* is the genetic enhancement of seedling vigor. A positive correlation was found between seed weight and seedling vigor (Beuselinck and McGraw, 1983, Collado and Mujica, 2002). The role and importance of cotyledons was also determined in the early stage of growth (Mujica and Rumi, 1998), while a multiple regression analysis applied to 20 progenies of random polycross indicated that 43 % of seedling vigor was determined by the seed weight and the surface of cotyledons (Collado and Mujica, 2002). About this species, Sasal *et al.* (2001) reported that the shading of seedlings negatively affected the accumulation of dry weight plant and the issuance of stems at the crown and therefore seedling vigor. Moreover, inter- and intra-population variability was detected in seedling vigor and characters linked to it in improved

esta especie, que el sombreado de las plántulas afectó negativamente la acumulación del peso seco aéreo y la emisión de tallos en la corona y, por tanto, el vigor de las plántulas. Además, se ha detectado variabilidad inter e intrapoblacional para el vigor de plántula y caracteres vinculados a éste en poblaciones mejoradas (Colares *et al.*, 1999) y naturales de esta especie (Ixtaina y Mujica, 2003).

Para la mejora genética es relevante conocer la existencia de interacción genotipo \times ambiente (Annicchiarico, 2002), la cual implica que los valores fenotípicos relativos de los genotipos cambian al ser expuestos a diferentes ambientes. Uno de los primeros aportes metodológicos para estudiar esa interacción se basó en el análisis de regresión (Eberhart y Russell, 1966). La ausencia de interacción entre genotipos y localidades implica el beneficio de un uso más extendido de las mejores variedades a regiones geográficas más amplias con diferentes ambientes (Tigerstedt, 1994), lo cual contribuye al beneficio de una mayor seguridad de cosecha (Clawson, 1985). Una variedad estable es aquella que no presenta interacción con el ambiente (Márquez-Sánchez, 1973). La estabilidad del comportamiento varietal fue descrita por Allard y Bradshaw (1964) quienes señalan dos tipos de amortiguamiento, individual y poblacional, como mecanismos explicativos de la estabilidad del fenotipo, y que son consecuencia de la estructura genética de las poblaciones. En *L. tenuis* se ha encontrado interacción poblaciones \times ambientes para el vigor de las plántulas (Ixtaina y Mujica, 2003) y también hay efectos de diferentes factores del ambiente. Según Sevilla y Fernández (1991), el éxito de la emergencia y establecimiento de plántulas en regiones forrajeras está fuertemente regulado por factores abióticos y bióticos, con importancia relativa según los caracteres biológicos de la especie y el ambiente del desarrollo. De *L. corniculatus*, Cooper (1966) reporta que un bajo nivel de luz no afectó la sobrevivencia de plántulas, pero disminuyó la tasa relativa de crecimiento y la altura de las mismas a las ocho semanas de vida. Además, este factor asociado con alta temperatura y estrés hídrico, causó una reducción en el peso seco aéreo y radicular. Vignolio *et al.* (1999) indican que *L. tenuis* tiene caracteres relacionados con la tolerancia al anegamiento, que deberían considerarse en los programas de selección.

La investigación del vigor de plántula y otros caracteres relacionados con la habilidad competitiva

(Colares *et al.*, 1999) and natural populations of this species (Ixtaina and Mujica, 2003).

Also relevant to genetic improvement it is to know about the existence of genotype \times environment interaction (Annicchiarico, 2002), which implies that the relative phenotypic values of genotypes change when exposed to different environments. One of the first methodological contributions to the study of such interaction was based on the regression analysis (Eberhart and Russell, 1966). The absence of interaction among genotypes and locations involves the benefit of using the best varieties spread to wider geographical regions including different environments (Tigerstedt, 1994), which contributes to the benefit of greater security at harvest (Clawson, 1985). A stable variety is that having no interaction with the environment (Márquez-Sánchez, 1973). The stability of varietal performance was proposed by Allard and Bradshaw (1964), who describe two types of buffer, individual and population, as explanatory mechanisms of phenotype stability, which are a consequence of the genetic structure of populations. In *L. tenuis*, the population \times environment interaction for seedling vigor has been detected (Ixtaina and Mujica, 2003) and also there are different environmental factors. According to Sevilla and Fernández (1991), the successful emergence and establishment of seedlings in regions are heavily regulated by abiotic and biotic factors, with relative importance, according to the biological characters of the species and the development environment. On *L. corniculatus*, Cooper (1966) reported that a low light level did not affect seedlings survival, but decreased their relative growth rate and height after eight weeks. Furthermore, this factor associated with high temperature and water stress decreased air and root dry weight. Vignolio *et al.* (1999) have reported that *L. tenuis* has characters related to tolerance to flooding, to be taken into account in the selection programmes.

The investigation of the seedling vigor and other characters related to competitive ability during the early growth stage of *L. tenuis* under different environments should contribute to the design of improved implantation strategies and selection criteria. An initial phase of study under semicontrolled experimental conditions should produce knowledge to adjust the design and focus of future field experimentation in grasslands.

durante la etapa inicial del crecimiento de *L. tenuis* en diferentes ambientes debe contribuir al diseño de mejores estrategias de implantación y criterios de selección. Una etapa inicial de estudio en condiciones experimentales semicontroladas, debe producir conocimientos para ajustar el diseño y enfoque de futuros experimentos de campo en los pastizales.

El objetivo de este trabajo fue evaluar la influencia de variaciones ambientales en la disponibilidad de agua, luz y nutrientes en caracteres involucrados en el éxito de la implantación de poblaciones naturales de *L. tenuis*.

MATERIALES Y MÉTODOS

El experimento se realizó en el Jardín Experimental de la Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales de la Universidad Nacional de La Plata (34° 54' S, 57° 55' O), Argentina. Los materiales biológicos utilizados fueron poblaciones naturales de una colección de germoplasma de distintos sitios de la Pampa Deprimida Bonaerense: Azul (P₁), Navarro (P₂), San Vicente (P₃), Ranchos (P₄), Brandsen (P₅), Magdalena (P₆) y Dolores (P₇). Los ambientes estudiados fueron ocho combinaciones de dos niveles de cada uno de tres factores: anegamiento (con y sin), fertilización (con y sin) y sombreado (con y sin).

El diseño experimental fue completamente aleatorizado con dos repeticiones. La siembra se realizó a 5 mm de profundidad en macetas de 5 L (unidades experimentales), llenas de tierra homogeneizada, al aire libre. La semilla fue escarificada mecánicamente, ajustando la densidad de cada población según pruebas de germinación para lograr 30 plántulas maceta⁻¹.

Las macetas asignadas a presencia de anegamiento se inundaron a los 38 dds (días después de la siembra) y se permanecieron en estado de saturación hasta el final del experimento. La saturación se determinó por la formación de una película brillante en la superficie de la tierra, característica de esta condición. Los riegos se realizaron para mantener la saturación. En las unidades experimentales de ausencia de anegamiento sólo se regó para un normal crecimiento de las plántulas. Esto se logró mediante un monitoreo diario y riego moderado, evitando la saturación. En las unidades experimentales que recibieron fertilizante se aplicó la fórmula 12-5-14-1 de N P K Mg (Nitrofoska, BASF), mediante 200 cm³ de solución (3 g Nitrofoska L⁻¹), en dos aplicaciones (38 y 49 dds). En este caso, el sombreado se realizó desde los 38 dds hasta el final del experimento, cubriendo las macetas con una bolsa (45 cm × 40 cm) de tela plástica conocida como media sombra, con trama de $\theta \cong 1.5$ mm. La intensidad lumínica del interior de la bolsa se determinó al mediodía (en la base, centro y extremo superior); el valor promedio fue 454.0 (± 5) $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

The objective of this study was to evaluate the influence of environmental variations on the availability of water, light and nutrients in characters involved in the successful implantation of natural populations of *L. tenuis*.

MATERIALS AND METHODS

The experiment was carried out at the Experimental Garden of the School of Agricultural Sciences and Forestry of the Universidad Nacional de La Plata (34° 54' S, 57° 55' W), Argentina. The biological materials used were natural stocks of a collection of germplasm from different sites of the Pampa Deprimida Bonaerense: Azul (P₁), Navarro (P₂), San Vicente (P₃), Ranchos (P₄), Brandsen (P₅), Magdalena (P₆) and Dolores (P₇). The environments studied were eight combinations of two levels of each of the three factors: flooding (with and without), fertilization (with and without) and shading (with and without).

The experimental design was completely randomized with two replications. Sowing was made at 5 mm deep in pots of 5 L (experimental units) filled with homogenized soil and placed outdoors. The seed was scarified mechanically adjusting the density of each population in accordance with germination tests to obtain 30 seedlings pot⁻¹.

The pots assigned to flooding were flooded at 38 das (days after sowing) and remained in a state of saturation to the end of the experiment. The saturation was determined by the formation of a shiny film on the land surface, characteristic of this condition. Irrigation was done as needed to maintain saturation. In the experimental units under the absence of flooding condition irrigation was made only for normal growth of seedlings. This was achieved through a daily monitoring and moderate irrigation, avoiding saturation. The formula 12-5-14-1 of NPK Mg (Nitrofoska, BASF) was applied, in the experimental units that received fertilizer, using 200 cm³ of solution (3 g Nitrofoska L⁻¹) in two applications (38 and 49 das). In this case shading was done 38 das until the end of the experiment, covering the pots with a bag (45 cm × 40 cm) of plastic material, known as partial shade, with a weft of $\theta \cong 1.5$ mm. Light intensity inside the bag was found at noon (at the base, center and top); the average value was 454.0 (± 5) $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

Harvest was done 175 das by cutting with a scalpel just below the crown of the seedlings and 20 individuals were randomly selected from each experimental unit. The characters evaluated were: (1) number of stems at the crown over or equal to 1 cm in length (Nt); (2) length of main stem (longer stem grown in the crown) (Lt); (3) number of leaves unfolded in main stem (Nh); (4) air dry weight (PSA), which included leaves, stems and crown (g

La cosecha se realizó a los 175 dds cortando con bisturí inmediatamente debajo de la corona de las plántulas y se seleccionaron al azar 20 individuos de cada unidad experimental. Los caracteres evaluados fueron: 1) número de tallos en la corona mayores o iguales a 1 cm de longitud (Nt); 2) longitud del tallo principal (tallo de mayor longitud originado en la corona) (Lt); 3) número de hojas desplegadas en el tallo principal (Nh); 4) peso seco aéreo (PSa), que incluyó hojas, tallos y corona (g MS plántula⁻¹), determinado después de secar las muestras en estufa a 60 °C hasta peso constante. El valor de cada carácter en cada unidad experimental fue el promedio de los 20 individuos.

El efecto de los cuatro factores y de sus interacciones en cada variable se evaluó mediante análisis de varianza. También se realizó un análisis de varianza bifactorial para los factores: poblaciones (7 niveles) y ambientes (8 niveles, resultantes de la combinación de disponibilidad de agua, luz y nutrientes). Previo al análisis de la varianza se realizó la prueba de Cochran para homogeneidad de varianzas (Hines y Montgomery, 1990). De acuerdo con el resultado se transformaron los datos de Nt y Nh con la conversión $\sqrt{y+1}$. Para comparar las medias se usó la prueba de Tukey ($p \leq 0.05$).

También se calculó el coeficiente de variación por poblaciones para el conjunto de ocho ambientes y dos repeticiones (n=16) y la correlación entre cada par de caracteres estudiados (n=112). Para hacer estos análisis y cálculos se utilizó el programa Statgraphic Plus 4 (Statistical Graphics Corporation, 1997).

A partir del análisis de varianza se estimó la proporción de variabilidad explicada por los factores correspondientes mediante el coeficiente de determinación de Pearson (R^2):

$$R^2 = SC_{factor} / SC_{total} \times 100$$

donde, SC_{factor} = suma de cuadrados del factor; SC_{total} = suma de cuadrados total.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Según el análisis de varianza hubo significación en poblaciones (P) para peso seco aéreo PSa, disponibilidad hídrica (A) y lumínica (S) para todos los caracteres, pero no en fertilizante (F) (Cuadro 1). Las interacciones entre dos factores fueron significativas sólo para P×S en Nt y para A×S en Lt y PSA. Entre tres factores la única interacción significativa fue P×F×S para Lt (Cuadro 1).

La media y el coeficiente de variación de cada combinación de población y carácter se muestran en el Cuadro 2. Respecto a las medias de las poblaciones sólo hubo tres diferencias significativas ($p \leq 0.05$)

DM seedling⁻¹), determined after drying the samples in an oven at 60 °C to constant weight. The value of each character in each experimental unit was the average of the 20 individuals.

The effect of the four factors and their interactions on each of the variables was evaluated using analysis of variance. Also an analysis of bivariate variance was performed for the factors: populations (7 levels) and environments (8 levels resulting from the combination of water, light and nutrient availability). Prior to the analysis of variance the Cochran test for homogeneity of variances was performed (Hines and Montgomery, 1990). According to the result the Nt and Nh data were transformed with the conversion $\sqrt{y+1}$. To compare the means the Tukey test ($p \leq 0.05$) was used.

Also a calculation was made of the coefficient of variation for populations for the group of eight environments and two replications (n=16) and the correlation between each pair of characters studied (n=112). To perform these analyses and calculations the computer programme Statgraphics Plus 4 (Statistical Graphics Corporation, 1997) was used.

From the analysis of variance the proportion of variability resulting from relevant factors was estimated by using the Pearson (R^2) coefficient of determination:

$$R^2 = SC_{factor} / SC_{total} \times 100$$

where SC_{factor} = sum of squares of the factor; SC_{total} total sum of squares.

RESULTS AND DISCUSSION

According to the analysis of variance, in populations (P) there were significant values for air dry weight (PSA), availability of water (A) and light (S) for all characters, but not in fertilizer (F) (Table 1). Interactions between two factors were significant only in P×S Nt and A×S in Lt and PSA. Among three factors the only significant interaction was P×F×S for Lt (Table 1).

The mean and variation coefficient for each combination of population and character are shown on Table 2. Regarding the population means only three significant differences ($p \leq 0.05$) were found in PSA: P_5 exceeded that of P_1 , P_3 and P_4 (Table 2). The results show little seedling vigor variation among populations measured by PSA, and a lack of variation for the rest of characters, suggesting a limited expectation response to the selection. Other experiences have shown greater variability among

en PSa: la P₅ superó la de P₁, P₃ y P₄ (Cuadro 2). Los resultados muestran una escasa variación entre poblaciones para el vigor de plántula medido por el PSa y ausencia de variación para los otros caracteres, lo que sugiere una limitada expectativa de respuesta a la selección. Otros resultados han mostrado mayor variabilidad entre poblaciones mejoradas (Colares *et al.*, 1999), que posiblemente se han diferenciado por efecto de la selección artificial y en poblaciones naturales de otro origen (Ixtaina y Mujica, 2003), modeladas por la selección natural en otros ambientes. Además, en estos dos experimentos se encontró una elevada variabilidad fenotípica intrapoblacional en el PSa, indicando la conveniencia de la selección a este nivel. Los valores de CV (%) por población muestran una elevada variabilidad fenotípica de las poblaciones para PSa, media para Nt y Lt y baja para Nh como respuesta a todas las variaciones ambientales ensayadas.

Respecto al efecto de la disponibilidad hídrica, se destaca el aumento del PSa, de Lt y del Nh, en condiciones de anegamiento (Cuadro 3), que evidencian el comportamiento tolerante de esta especie y que puede ser una ventaja competitiva con respecto a otras especies en estas condiciones. Estos resultados concuerdan

improved populations (Colares *et al.*, 1999), that have possibly differentiated as a result of artificial selection and in natural populations of a different origin (Ixtaina and Mujica, 2003), modeled by natural selection in other environments. Further with these two experiments a high intrapopulation phenotypic variability in PSA was found, indicating the appropriateness of the selection at this level. The CV values (%) by population show a high phenotypic variability of populations for PSA, medium for Nt and Lt and low for Nh as a response to all the environmental variations tested.

Regarding the effect of water availability, the increase of PSA, Lt and Nh in flooded conditions (Table 3) is outstanding, which points out the tolerant behavior of this species, which may be a competitive advantage in relation to other species under these conditions. These results are consistent with those reported by Vignolio *et al.* (1999) for *L. tenuis*.

The lack of response to fertilization (Tables 1 and 3) is attributed to the fact that the provision of nutrients was not a limiting factor of the juvenile stage of seedlings that could have minimized the answer to differences in nutrient availability.

Cuadro 1. Cuadrados medios y significancia de los valores de F para cuatro caracteres del experimento de cuatro factores.
Table 1. Mean squares and significance of F values for four characters of the four factor experiment.

Fuente de variación	Caracteres			
	Nt [†]	Lt [‡]	Nh [§]	PSa [¶]
Poblaciones (P)	11.0	11.72	0.1	2200.0**
Disponibilidad de agua (A)	25.2*	39.46*	2.5*	7910.5***
Disponibilidad de fertilizante (F)	3.9	29.11	0.3	682.5
Disponibilidad de luz (S)	726.8 ***	239.68 ***	2.9 **	91927.5 ***
P × A	7.6	9.46	0.3	244.1
P × F	7.6	11.29	0.5	258.6
P × S	11.3*	10.79	0.4	217.2
A × F	1.0	5.56	0.1	0.7
A × S	14.9	119.73***	0.1	18652.0***
F × S	5.4	5.01	0.0	963.0
P × A × F	10.0	9.09	0.1	173.0
P × A × S	3.9	4.22	0.7	637.9
P × F × S	3.9	26.32**	0.2	518.8
A × F × S	6.1	5.27	0.5	75.5
P × A × F × S	6.8	9.99	0.6	506.0

[†]Nt = número de tallos en la corona (valores expresados en 10⁵); [‡]Lt = longitud del tallo principal; [§]Nh = número de hojas en el tallo principal (valores expresados en 10⁵); [¶]PSa = peso seco aéreo (valores expresados en 10⁵) ♦ [†]Nt = number of stems in the crown (values expressed in 10⁵); [‡]Lt = length of main stem; [§]Nh = number of leaves on the main stem (values expressed in 10⁵), FPSa = air dry weight (values expressed in 10⁵).

*, **, ***, p ≤ 0.05, 0.01, 0.001.

Cuadro 2. Valores promedio y coeficiente de variación por poblaciones de *L. tenuis* y promedio general en cuatro caracteres.
Table 2. Mean values and coefficient of variation for populations of *L. tenuis* and general average in four characters.

Poblaciones	Carácter							
	Nt [†]		Lt [‡]		Nh [§]		PSa [¶]	
	Promedio (no.)	CV [□] (%)	Promedio (cm)	CV (%)	Promedio (no.)	CV (%)	Promedio (g)	CV (%)
P ₁ ^{††}	6.2 a	26.5	14.3a	20.7	10.7 a	9.8	0.160 a	66.3
P ₂ ^{††}	5.8 a	21.6	16.7 a	29.9	10.5 a	10.0	0.208 ab	72.4
P ₃ ^{††}	6.0 a	18.5	16.2 a	16.8	10.2 a	13.7	0.163 a	71.1
P ₄ ^{††}	6.0 a	21.1	15.7 a	19.1	10.2 a	8.4	0.150 a	71.1
P ₅ ^{††}	5.4 a	28.4	16.9 a	23.4	10.4 a	12.0	0.259 b	58.2
P ₆ ^{††}	6.3 a	28.9	16.4 a	21.2	10.3 a	15.0	0.227 ab	54.7
P ₇ ^{††}	5.9 a	23.4	16.3 a	15.9	10.5 a	13.4	0.206 ab	63.2
Promedio	5.9	23.8	16.1	21.4	10.4	11.7	0.196	65.6

[†]Nt = número de tallos en la corona; [‡]Lt = longitud del tallo principal; [§]Nh = número de hojas en el tallo principal; [¶]PSa = peso seco aéreo; [□]CV = coeficiente de variación; ^{††}P₁ a P₇ = poblaciones naturales de *L. tenuis* ♦ Nt = number of stems in the crown; [‡]Lt = length of main stem; [§]Nh = number of leaves on main stem; [¶]PSA = air dry weight; [□]CV = coefficient of variation; ^{††}P₁ to P₇ = natural populations of *L. tenuis*. Promedios con distinta letra en una columna son estadísticamente diferentes (p ≤ 0.05) ♦ Means with different letter in a column are statistically different (p ≤ 0.05).

con lo informado por Vignolio *et al.* (1999) para *L. tenuis*.

La ausencia de respuesta a la fertilización (Cuadros 1 y 3), se atribuye a que la provisión de nutrientes no fue un factor limitante del estadio juvenil de las plántulas que podría haber minimizado la respuesta a las diferencias en la disponibilidad de nutrientes.

La condición de sombreado redujo significativamente (p ≤ 0.5) el PSa, Nt y Nh en la rama principal, y aumentó la Lt (Cuadro 3). Si bien el sombreado no se realizó desde el inicio del experimento, estos resultados coinciden con los obtenidos por Mujica y Rumi (1998) y Sasal *et al.* (2001), quienes observaron una disminución en el PSa debido al sombreado de los cotiledones y de las plántulas. Mujica y Rumi (1998) encontraron una disminución de Nh y Nt en condiciones de restricción lumínica de los cotiledones y destacan que los caracteres afectados serían estratégicos en la competencia por el espacio aéreo. Así, recomiendan minimizar el sombreado de los cotiledones mediante una intensa defoliación del pastizal para favorecer la implantación.

Además de las interacciones P × S y P × F × S, considerando sólo los factores ambientales, la única interacción significativa detectada fue S × A, para Lt y PSa (Cuadro 1). El mayor PSa encontrado en las plántulas sometidas a anegamiento y sin restricción lumínica (As) (Cuadro 3), puede explicarse por un

The condition of shading significantly reduced (p ≤ 0.05) PSA, Nt and Nh in the main branch, and increased Lt (Table 3). While shading was not performed from the start of the experiment, these results agree with those obtained by Mujica and Rumi (1998) and Sasal *et al.* (2001) who found a decrease in PSA as a result of shading of the cotyledons and seedlings. Mujica and Rumi (1998) found a decrease of Nh and Nt in restricted light conditions of cotyledons and emphasized that the characters affected would be strategic in the competition for air space. Thus, they recommend to reduce the shading of cotyledons to a minimum through an intensive defoliation of grassland to favor implantation.

Besides the interactions P × S and P × F × S, given environmental factors alone, the only significant interaction detected was S × A, for Lt and PSA (Table 1). The biggest PSA found in seedlings subject to flooding and unrestricted light (As) (Table 3) can be explained by the positive effect of abundant water, which prevented a possible temporary water stress, mainly at noon. By contrast, in these seedlings subjected to shading, while showing a minor PSA, this character was not significantly affected by water restriction.

In Table 4 it is shown a summary of the variance analysis, considering the seven populations of *L. tenuis* and eight environments by combination of water, light and fertilizer variants. Besides the

Cuadro 3. Promedios de tres caracteres según disponibilidad de agua, nutrientes y luz, e interacción significativa disponibilidad de agua × luz ($p \leq 0.05$), para *L. tenuis*.
Table 3. Averages of four characters depending on the availability of water, nutrients and light and significant water availability-light availability interaction ($p \leq 0.05$) for *L. tenuis*.

Factor del ambiente		Carácter			
		Nt [†]	Lt [‡] (cm)	Nh [§]	PSa [¶] (g)
Disponibilidad de agua	A [□]	5.7 ¹	16.7 ²	10.9 ²	0.221 ²
	a [□]	6.2 ²	15.0 ¹	9.9 ¹	0.166 ¹
Disponibilidad de nutrientes	F ^{††}	5.9 ¹	15.3 ¹	10.5 ¹	0.202 ¹
	f ^{††}	6.0 ¹	16.5 ¹	10.3 ¹	0.186 ¹
Disponibilidad de luz	S ^{¶¶}	4.8 ^A	17.3 ^B	10.1 ^A	0.096 ^A
	s ^{¶¶}	7.1 ^B	14.6 ^A	10.7 ^B	0.285 ^B
Disponibilidad de agua × disponibilidad de luz	AS	4.4 ^a	17.2 ^b	10.4 ^a	0.083 ^a
	aS	5.1 ^b	17.3 ^b	9.8 ^a	0.110 ^a
	as	7.2 ^c	12.9 ^a	10.1 ^a	0.215 ^b
	As	7.0 ^c	16.2 ^b	11.3 ^b	0.355 ^c

[†]Nt = número de tallos en la corona; [‡]Lt = longitud del tallo principal; [§]Nh = número de hojas en el tallo principal; [¶]PSa = peso seco aéreo; [□]A/a = con/sin anegamiento; ^{††}F/f = con/sin fertilización; ^{¶¶}S/s = con/sin sombreado. [♦]Nt = number of stems in the crown; [‡]Lt = length o; [§]Nh = number of leaves on main [¶]PSA = airbove-ground dry weight; [□]A/a = with/without flooding; ^{††}F/f = with/without fertilization; ^{¶¶}S/s = with/without shade.

Superíndices con números arábigos, números romanos, letras mayúsculas o letras minúsculas diferentes indican diferencias significativas ($p \leq 0.05$) entre promedios con diferente disponibilidad de agua, nutrientes, luz e interacción disponibilidad de agua × disponibilidad de luz. [♦] Superscripts with Arabic numerals, Roman numerals, different uppercase or lowercase letters indicate significant differences ($p \leq 0.05$) among averages with different availability of water, nutrients, light and water availability × light availability interaction.

efecto positivo de la abundancia de agua, lo cual evitó un posible estrés hídrico temporario, principalmente al mediodía. Por el contrario, en las plántulas sometidas a sombreado, si bien presentaron un PSa menor, la restricción hídrica no afectó significativamente este carácter.

En el Cuadro 4 se presenta el resumen de los análisis de varianza, considerando las siete poblaciones de *L. tenuis* y ocho ambientes por combinación de variantes de agua, luz y fertilizante. Además del efecto de poblaciones para PSa, se encontró efecto de ambientes en todas las variables pero no hubo interacción poblaciones × ambientes en los caracteres estudiados (Cuadro 4). Esta ausencia de detección de interacción poblaciones × ambientes se diferencia del resultado encontrado en el análisis de varianza multifactorial (Cuadro 1). El análisis bifactorial, al considerar al ambiente como la combinación de los tres factores sin discriminar cada uno de sus componentes, impide detectar interacciones significativas entre las poblaciones y alguno de los factores ambientales estudiados. El ambiente mostró el mayor porcentaje de la suma de cuadrados total del experimento (R^2 de 20 a 60 %), variable según el carácter estudiado, mientras que para el factor población R^2 fueron de 2 a 6 %.

effect of populations regarding PSA, environments were found to have an effect on all variables while no population × environments interaction was detected for any of the characters studied (Table 4). The fact of not detecting the interaction population × environment differs from the result found in the multivariate variance analysis (Table 1). Considering the environment as the combination of the three factors without discriminating each of its components, the bivariate analysis impedes detecting significant interactions among populations and some of the environmental factors studied. The environment showed the highest percentage of the total sum of squares of the experiment (R^2 from 20 to 60 %), changeable according to the character studied, while for the population factor R^2 ranged from 2 to 6 %.

The population × environment interaction (Table 1) for the PSA was not significant but it was so for Nt ($P \times S$) and Lt ($P \times F \times S$). This means that the relative phenotypic values of Nt and Lt changed when exposed to differences in light availability or nutrients and light. This could imply the need to develop varieties for specific environments. The absence of the environments ×

Cuadro 4. Cuadrados medios y significancia de los valores de F para cuatro caracteres del experimento de dos factores.
Table 4. Mean squares and significance of F values for four characters of the two-factor experiment.

Fuente de variación	Carácter			
	Nt [†]	Lt [‡]	Nh [§]	PSa [¶]
Poblaciones	11.0	11.72	0.1	2200.0**
Ambientes	110.0***	64.05***	1.1***	19800.0***
Poblaciones × ambientes	7.9	9.76	0.39	700.0

[†]Nt = número de tallos en la corona (valores expresados en 10⁵); [‡]Lt = longitud del tallo principal; [§]Nh = número de hojas en el tallo principal (valores expresados en 10⁵); [¶]PSa = peso seco aéreo (valores expresados en 10⁵); [†]Nt = number of stems in the crown (values expressed in 10⁵); [‡]Lt = length of main stem; [§]Nh = number of leaves on the main stem (values expressed in 10⁵), [¶]PSA = air dry weight (values expressed in 10⁵).
 *, **, ***, p ≤ 0.05, 0.01, 0.001.

La interacción poblaciones × ambientes (Cuadro 1), para el PSa no fue significativa pero sí lo fue para Nt (P×S) y Lt (P×F×S). Esto significa que los valores fenotípicos relativos de Nt y Lt cambiaron al ser expuestos a diferencias en la disponibilidad de luz o de nutrientes y luz. Esto implicaría la necesidad de generar variedades para ambientes específicos. La ausencia de interacción poblaciones × ambientes en PSa es un indicador promisorio para mejorar el vigor de las plántulas, lo cual debe ser validado en condiciones de campo. Si fuera así, se podría esperar mayor eficiencia en la selección y un uso más extendido de las mejores variedades a áreas geográficas más amplias que incluyen diferentes ambientes (Tigerstedt, 1994). Una variedad estable es aquella que no presenta interacción con el ambiente (Márquez-Sánchez, 1973).

Posiblemente la estructura genética de las poblaciones naturales de *L. tenuis* sea la principal causa de la ausencia o escasa interacción poblaciones × ambientes encontrada. En las poblaciones, una estructura genética caracterizada por un bajo nivel de heterogeneidad es más sensible a la variación de las condiciones ambientales que una de alta heterogeneidad (Becker, 1988). Debido a la elevada alogamia de *L. tenuis*, favorecida por un sistema genético de autoincompatibilidad (Lundqvist, 1993), se espera que las poblaciones naturales presenten una estructura genética caracterizada por una amplia diversidad genética y alta heterocigocis. Esto explica la estabilidad del comportamiento de las poblaciones en diferentes ambientes fundamentalmente por el mecanismo de amortiguamiento poblacional (Allard y Bradshaw, 1964). Clawson (1985), al referirse en general a la seguridad de cosecha de las variedades

populations interaction in PSA is a promising indicator for improving seedling vigor, which must be validated in field conditions. If so, we would expect greater efficiency in the selection and a more widespread use of the best varieties to broader geographic areas with different environments (Tigerstedt, 1994). A stable variety is that having no interaction with the environment (Márquez-Sánchez, 1973).

Perhaps the genetic structure of the natural populations of *L. tenuis* is the main cause of the absence or low populations environments interaction. In populations, a genetic structure characterized by a low level of heterogeneity is more sensitive to a variation of environmental conditions than that of high heterogeneity (Becker, 1988). Due to the high allogamy of *L. tenuis*, supported by a genetic system of self-compatibility (Lundqvist, 1993), natural populations are expected to show a genetic structure characterized by a wide genetic diversity and high heterocigocis. This explains the stable behavior of populations in different environments, mainly because of the mechanism of population buffer (Allard and Bradshaw, 1964). Therefore, (1985) when referring in general to the harvest safety of local varieties, Clawson (1985) points out that this variability as the result of its population genetic structure characterized by a high genetic diversity.

The correlation analysis made for the seven populations in the eight environments studied showed a picture of logical associations in sign and magnitude. It highlights the correlation between PSA and Nt (R=0.57; p≤0.001). According to the results of this and other experiments (Colares *et al.*, 1999, Collado and Mujica, 2002), Nt is an important component of vigor, and the speed in the

locales, indica que esta variabilidad se debe a su estructura genética poblacional caracterizada por una alta diversidad genética.

El análisis de correlación en el que se consideró las siete poblaciones en los ocho ambientes estudiados, mostró un panorama de asociaciones lógicas en signo y magnitud. Se destaca la correlación entre PSa y Nt ($R=0.57$; $p \leq 0.001$). Según los resultados de éste y otros experimentos (Colares *et al.*, 1999; Collado y Mujica, 2002), el Nt es un componente importante del vigor, y la rapidez en la emisión de tallos podría ser un carácter promisorio para considerarse en la mejora del vigor de plántulas.

El análisis de los resultados remarca el interés de profundizar en futuros estudios el conocimiento sobre la variabilidad del vigor de plántula entre y dentro de poblaciones, sus componentes genéticos, ambientales y la interacción con el ambiente. También es fundamental validar los resultados de investigaciones semicontroladas en las condiciones naturales de los pastizales de la región.

CONCLUSIONES

El vigor de las plántulas resultó muy condicionado por la disponibilidad de agua y, especialmente, luz. Por tanto, estos factores deben tenerse en cuenta en la planificación de la siembra. La ausencia de interacción poblaciones \times ambientes para PSa, un componente importante del vigor de las plántulas, es promisoria para la mejora genética. El número de tallos en la corona, considerado un componente estratégico del vigor, debe ser incluido en los programas de selección.

LITERATURA CITADA

- Allard, R. W., and A. D. Bradshaw. 1964. Implications of genotype-environment interactions in applied plant breeding. *Crop Sci.* 4: 503-508.
- Annicchiarico, P. 2002. Genotype \times environment interactions. Challenges and opportunities for plant breeding and cultivar recommendations. FAO Plant Production and Protection Papers 174. Food and Agriculture Organization of the United Nations. Roma. 126 p.
- Becker, H. C. 1988. Stability analysis in plant breeding. *Plant Breeding* 101: 1-23.
- Beuselinck, P. R., and R. L. Mc Graw. 1983. Seedling vigor of three *Lotus* species. *Crop Sci.* 23: 390-391.
- Clawson, D. L. 1985. Harvest security and intra-specific diversity in traditional tropical agriculture. *Econ. Bot.* 39: 56-67.

growth of stems could be a promising feature to be considered for improving seedling vigor.

The analysis of the results underline the interest of developing more in-depth studies on the variability of seedling vigor among and within populations, their genetic and environmental components, and the interaction with the environment. It is also fundamental to validate the results of semicontrolled research under the natural conditions of grasslands in the region.

CONCLUSIONS

The vigor of seedlings was largely influenced by the availability of water and, especially, light. Therefore these factors should be considered when scheduling sowing. The absence of the population \times environment interaction for PSA - an important component of the vigor of seedlings - is promising for genetic improvement. The number of stems in the crown, considered an strategic component of vigor, should be included in selection programs.

—End of the English version—

-----*-----

- Colares, M., M. M. Mujica, and C. P. Rumi. 1999. Analysis of the early expression characters of *Lotus glaber* Mill. (= *Lotus tenuis* Waldst. et Kit. ex Wild.). *Lotus Newsletter*. Available in: <http://www.psu.missouri.edu/lnl/>. (29/07/2008).
- Collado, M. B., y M. M. Mujica. 2002. Aprovechamiento de la heterosis y rol de dos caracteres determinantes del vigor de las plántulas de *Lotus glaber*. Actas del XXI Congreso Argentino de Genética La Plata, Argentina. pp: 122.
- Cooper, C. 1966. Response of birdsfoot trefoil and alfalfa to various levels of shade. *Crop Sci.* 6: 63-66.
- Eberhart, S. A., and W. A. Russell. 1966. Stability parameters for comparing varieties. *Crop Sci.* 6: 36-40.
- Hines, W., and D. Montgomery. 1990. Probability and Statistics in Engineering and Management Science. John Wiley, Nueva York.
- Insausti, P., y P. Quinos. 2000. Prácticas sustentadas en estudios ecológicos que mejoran la oferta forrajera en un pastizal natural de la Pampa Deprimida (Argentina). Actas de la XVI Reunión Latinoamericana de Producción Animal, Montevideo, Uruguay. 56 p.
- Ixtaina, V. Y., y M. M. Mujica. 2003. Variabilidad inter e intra poblacional e interacción poblaciones-ambiente en el vigor de plántula de *Lotus glaber*. Actas del XXXII Congreso Argentino de Genética. Córdoba, Argentina. pp: 127.

- Lundqvist A. 1993. The self-incompatibility system in *Lotus tenuis* (Fabaceae). *Hereditas* 119: 59-66.
- Márquez-Sánchez, F. 1973. Relationship between genotype-environmental interaction and stability parameters. *Crop Sci.* 13: 577-579.
- McGraw R. L., P. R. Beuselinck, and G. C. Marten. 1989. Agronomic and forage quality attributes of diverse entries of birdsfoot trefoil. *Crop Sci.* 29: 1160-1164.
- Miñón, D. P., y M. R. Colabelli. 1993. Intersiembra de *Lotus tenuis* en tres comunidades nativas de la Pampa Deprimida. *Rev. Argentina Prod. Anim.* 13: 133-140.
- Mujica, M. M., y C. P. Rumi. 1998. El crecimiento inicial de *Lotus glaber* afectado por la remoción y el sombreado de los co-tiledones. *Rev. de la Facultad de Agronomía* 103: 127-133.
- Quinos, P., P. Insausti, and A. Soriano. 1998. Facilitative effect of *Lotus tenuis* on *Paspalum dilatatum* in lowland grassland of Argentina. *Oecología* 114: 427-431.
- Sasal, Y., J. Guiamet, y M. M. Mujica. 2001. Efectos del sombreado sobre la longevidad foliar y el crecimiento en plántulas de *Lotus glaber*. *Actas XXVIII Jornadas Argentinas de Botánica Santa Rosa, La Pampa, Argentina.* pp: 81.
- Sevilla, G. H., y O. N. Fernández. 1991. Leguminosas forrajeras herbáceas; emergencia y establecimiento de plántulas. *Rev. Argentina Prod. Anim.* 11(4): 419-429.
- Statistical Graphics Corporation. 1997. *Statgraphics Plus for Windows.* Versión 3.1. Rockville.
- Tigerstedt, P. M. A. 1994. Adaptation, variation and selection in marginal areas. *Euphytica* 77: 171-174.
- Tricart, F. 1973. Geomorfología de la Pampa Deprimida. INTA, Colección Científica N° XII: 1-202.
- Vignolio, O., O. Fernandez, and N. Maceira. 1999. Flooding tolerance in five populations of *Lotus glaber* Mill. (*Syn. Lotus tenuis* Waldst et Kit.). *Austr. J. Agric. Res.* 50: 555-559.