

Universidad Nacional del Litoral
Facultad de Ciencias Agrarias

Tesis para optar por el grado académico de:
Doctor en Ciencias Agrarias

“Mecanismos de tolerancia al glifosato en *Parietaria debilis* y *Petunia axillaris*”

Ignacio Dellaferrera

Director: Prof. Dr. Pedro Jacob Christoffoleti

Co-Directora: Prof. Dra. Mariel Perreta

Esperanza, 2013

a Emilce y a Bruno

Agradecimientos

Agradezco a todas las personas que nombro a continuación por la innumerable cantidad de cosas que hicieron por la realización de esta tesis y no puedo nombrar en este texto tan breve.

A Mariel por guiarme en esta tarea

A Abelardo por darme las oportunidades

A Pedro por compartir su experiencia

A Rafael por recibirme en su laboratorio

A Alicia por sus lecturas criticas

A Elisa, Juanín, Andrea, Leandro, Gabriel y Vanesa por su ayuda

A Horacio, Mario y Marianela por el apoyo brindado

A Fidel, Antonia, Hugo, Jesús y José Luis

A mi familia

Uno, es resultado y parte del vinculo que forma con las personas que lo rodean, por eso, quiero también agradecer a todas las personas que aun sin nombrarlas podrán leer parte de sus discursos reflejados a través mío en este manuscrito.

Particularmente además, quiero también agradecer a las instituciones que a través de las personas que me brindaron el acceso a sus laboratorios y diversas instalaciones y recursos permitieron la realización de esta tesis.

A la Universidad Nacional del Litoral

Al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas

A la Universidad de Cordoba – España

A la Universidade de São Paulo – Brasil

Todos tenemos responsabilidades en nuestro camino y en esta parte de mi vida la mía es la de responder a todos los que me han brindado su apoyo y confianza para que culmine esta tesis.

Índice

Introducción.....	1
<i>Superficie foliar y absorción</i>	4
<i>Translocación del glifosato</i>	6
<i>Forma de crecimiento</i>	7
<i>Objetivos y estructura del trabajo</i>	9
<i>Objetivo general</i>	10
<i>Objetivos específicos</i>	10
Capítulo 1:	12
Sensibilidad diferencial y hormesis de las especies <i>Petunia axillaris</i> , <i>Parietaria debilis</i> , <i>Verbena litoralis</i> y <i>Amaranthus hybridus</i> al herbicida glifosato.....	12
Resumen	12
Introducción.....	12
Metodología.....	16
<i>Material vegetal</i>	16
<i>Ensayos de dosis-respuesta</i>	16
<i>Acumulación de ácido shikímico (skm)</i>	18
Resultados.....	18
<i>Ensayos de dosis respuesta</i>	18
<i>Efecto de hormesis</i>	20
<i>Acumulación de ácido shikímico</i>	21
Discusión	22
Conclusión.....	26
Capítulo 2:	28
Retención, absorción y translocación de glifosato	28
Resumen	28
Introducción.....	28
Metodología.....	31
<i>Material vegetal</i>	31
<i>Retención foliar del herbicida</i>	32
<i>Absorción y translocación de [¹⁴C]glifosato</i>	32
<i>Phosphor Imaging</i>	34
Resultados.....	34
<i>Retención foliar del glifosato</i>	34
<i>Absorción y translocación de [¹⁴C]glifosato</i>	35
<i>Phosphorimaging</i>	37
Discusión	38
Conclusión.....	41
Capítulo 3:	42
Superficie foliar y daño anatómico.....	42
Resumen	42
Introducción.....	42
Metodología.....	46
<i>Material vegetal</i>	46
<i>Caracterización de la superficie foliar</i>	46
<i>Caracterización de cantidad y calidad de ceras epicuticulares</i>	47
Resultados.....	49
<i>Caracterización de la superficie foliar</i>	49

<i>Anatomía foliar</i>	52
Discusión	55
Conclusiones.....	60
Capítulo 4:	61
Forma de crecimiento y alteraciones producidas por glifosato en <i>Petunia axillaris</i> y <i>Parietaria debilis</i>	61
Resumen	61
Introducción.....	61
Metodología.....	64
Resultados.....	66
Forma de crecimiento de <i>Petunia axillaris</i>	66
Forma de crecimiento de <i>Parietaria debilis</i>	69
Efecto de la aplicación de glifosato sobre la forma de crecimiento de <i>Petunia axillaris</i>	73
Efecto de la aplicación de glifosato sobre la forma de crecimiento de <i>Parietaria debilis</i>	75
Discusión	78
Conclusión.....	81
Discusión general	82
Conclusiones.....	88
Bibliografía.....	89

Resumen

La utilización repetida de glifosato como herbicida modifica, entre otros aspectos, la composición relativa de la flora de malezas en un área determinada, aumentando la frecuencia de individuos con baja sensibilidad al mismo. Si bien son varias las malezas que se han reportado como tolerantes al glifosato, la razón de dicha sensibilidad diferencial no está aún totalmente comprendida y la investigación al respecto es limitada. Entre los numerosos casos reportados de especies de malezas que han presentado algún inconveniente para su adecuado manejo se encuentran *Parietaria debilis*, *Petunia axillaris* y *Verbena litoralis*.

En este trabajo se evalúa la sensibilidad de las especies mencionadas en comparación con la especie *Amaranthus hybridus* y se estudian posibles mecanismos involucrados en su sensibilidad diferencial. Para esto se analiza la absorción y translocación con herbicida radiomarcado, la superficie foliar, y características morfológicas y anatómicas posiblemente relacionadas con la respuesta al herbicida. El objetivo es de caracterizar los mecanismos de tolerancia al herbicida glifosato en *Petunia axillaris*, *Parietaria debilis* y *Verbena litoralis*.

Los análisis realizados permiten comprobar que tanto *Petunia axillaris* como *Parietaria debilis* son especies tolerantes a glifosato mientras que *Verbena litoralis* es una especie sensible al mismo bajo las condiciones utilizadas en este trabajo.

Se confirma la inhibición de la ruta metabólica del ácido shikimico en *Amaranthus hybridus* y *Verbena litoralis* mientras que la misma no se ve alterada en *Petunia axillaris* y en *Parietaria debilis*, lo que indica que es un método de caracterización de la tolerancia de las especies de malezas al glifosato.

La retención foliar de glifosato es menor en las especies tolerantes, la absorción y translocación, por otra parte, difieren significativamente entre especies tanto en sus valores máximos como en los tiempos en alcanzar estos valores. Sin embargo, solo en *Parietaria debilis* se puede correlacionar su menor susceptibilidad con una reducida absorción y limitada translocación del herbicida, mientras que en *Petunia axillaris* la menor sensibilidad al glifosato podría estar relacionada a un mayor tiempo de absorción, lo cual retarda el ingreso y movimiento del herbicida, sumado a una distribución preferencial del glifosato hacia los meristemas.

En el caso de *Petunia axillaris*, además puede correlacionarse la menor retención y mayor tiempo de penetración del herbicida con una superficie foliar con alta

densidad de tricomas y una cantidad de ceras significativamente mayor que la especie sensible. *Parietaria debilis*, también posee una superficie foliar con gran densidad de tricomas. La cantidad de ceras epicuticulares de esta especie no difiere con la de la especie sensible, aunque la composición de ceras es diferente, encontrándose mayor proporción de grupos químicos de carácter hidrofóbico, lo que podría ser la razón principal para una menor penetración del herbicida.

El efecto del glifosato sobre la anatomía foliar a partir de las 12 hs. de aplicado el herbicida es una reducción del espesor de la lamina foliar causado por la reducción de la epidermis adaxial y el parénquima radiado para *Amaranthus hybridus*; y una reducción del espesor de lámina foliar debido a una reducción del parénquima lagunoso en *Parietaria debilis*. *Petunia axillaris* no mostró modificaciones.

En plantas aplicadas con glifosato, a pesar de la presencia de sectores de ejes afectados y de la menor cantidad de ramas resultantes en *Parietaria debilis* y del retraso de la floración en *Petunia axillaris*, la producción de flores y semillas de ambas especies es elevada, lo que asegura la perpetuación de los genotipos menos sensibles.

Summary

Repeated use of glyphosate as herbicide modified, among other things, the relative composition of the weed flora in a given area, increasing the frequency of individuals with low sensitivity. Although there are several weeds that have been reported as tolerant to glyphosate, the reason for the differential species sensitivity is not fully understood yet and information about this issue is limited. Among the many reported cases of weed species that have presented problems for proper management are *Parietaria debilis*, *Petunia axillaris* and *Verbena litoralis*.

This thesis evaluates the sensitivity of the forementioned species compared with *Amaranthus hybridus* and discusses possible mechanisms involved in the differential sensitivity. For this purpose, we analyzed the absorption and translocation of radiolabeled herbicide, leaf surface, and morphological and anatomical characteristics possibly related to the herbicide response. The objective is to characterize the mechanisms of tolerance to the herbicide glyphosate in *Petunia axillaris*, *Parietaria debilis* and *Verbena litoralis*.

Studies show that both *Parietaria debilis* and *Petunia axillaris* are glyphosate tolerant species while *Verbena litoralis* is sensitive to the herbicide under the conditions used in this work.

The inhibition of the shikimic acid metabolic pathway in *Amaranthus hybridus* and *Verbena litoralis* and the absence of modification in the pathway in *Petunia axillaris* and *Parietaria debilis* were confirmed, indicating that this method is adequate to characterize the tolerance of the weed species to glyphosate foliar retention is lower in glyphosate-tolerant species, but the absorption and translocation, on the other hand, differ significantly among species in their maximum values as well as in the time required to reach such values. However, only *Parietaria debilis* has the low susceptibility correlated with the reduced absorption and limited translocation of the herbicide, whereas the lower sensitivity to glyphosate in *Petunia axillaris* could be associated to increased time of absorption, which delays the entrance and movement of the herbicide, coupled with a preferential distribution of glyphosate to the meristems.

In *Petunia axillaris*, the lower retention and longer penetration of the herbicide may be correlated with the leaf surface trichomes in high density and the significantly higher amount of wax than in the sensitive species. *Parietaria debilis*, also show a dense trichome leaf surface and an absence of differences in the amount of epicuticular wax relative to the sensitive species. However, the epicuticular wax composition of *P. debilis* vs the sensitive species shows a greater proportion of chemical groups of hydrophobic character, which could be the main reason for reduced penetration of the herbicide in *P. debilis*.

Twelve hours after herbicide application a reduction of leaf lamina thickness caused by reduction of the adaxial epidermal and radial parenchyma for *Amaranthus hybridus*, and reduced leaf blade thickness due to a reduction in lacounous parenchyma in *Parietaria debilis* and no changes in *Petunia axillaris* were observed.

In plants treated with glyphosate, in spite of the presence of sectors of the axes and the reduced number of branches in *Parietaria debilis* and the delayed flowering in *Petunia axillaris*, flower seed or production in plants of both species is high which ensures the perpetuation of the less sensitive genotypes.

Introducción

La modificación del agroecosistema ocasionada por la siembra directa, la utilización de cultivares resistentes a glifosato y el uso intensivo de este herbicida, han producido cambios en la flora de malezas asociadas a los cultivos (Rodríguez, 2004). Desde el punto de vista ecológico, el control químico de malezas actúa como una importante fuerza de selección, mediante la modificación de la abundancia relativa, lo que provoca cambios en las relaciones de dominancia dentro de las comunidades de malezas (Vitta *et al.*, 2000). Esta selección puede darse a nivel intra o inter específico; en el primer caso cuando a partir de una población que originalmente era sensible a un herbicida resulta una subpoblación de individuos que no lo son, tendremos individuos resistentes; mientras que cuando la selección se produce a nivel inter específico, es decir la selección de especies que nunca fueron controladas por el herbicida, estamos frente a individuos tolerantes al herbicida (WSSA Terminology Committee, 1998). De esta forma una de las consecuencias del uso intensivo de un herbicida, con un mismo principio activo durante un periodo prolongado, será la aparición de individuos de malezas que posean algún grado de tolerancia o de resistencia (Christoffoleti *et al.*, 2008; Owen, 2008) o que posean mecanismos que le permitan escapar a la acción del herbicida (Scursoni & Satorre, 2010).

El uso intensivo de glifosato ha reducido la densidad de muchas especies de malezas antes presentes, mientras que al mismo tiempo, ha provocado el incremento de otras especies, algunas de las cuales no estaban presentes en los lotes cultivados. Dentro de estas últimas algunas presentan un alto grado de tolerancia al glifosato (Vitta *et al.*, 2004; Christoffoleti *et al.*, 2008). Si bien son varias las malezas que se han reportado como tolerantes al glifosato (Rodríguez, 2004; Leguizamón & Ferrari, 2005), la razón

de dicha sensibilidad diferencial no está aún totalmente comprendida (Norsworthy *et al.*, 2001; Monquero *et al.*, 2004a) y la investigación al respecto es limitada (Owen, 2008). Particularmente, la tolerancia puede estar relacionada con características histoquímicas que reducen la penetración y/o translocación del herbicida (Monquero *et al.*, 2004b; Sharma & Singh, 2007; Cruz-Hipolito *et al.*, 2009, 2011; Rojano-Delgado *et al.*, 2012), con formas de crecimiento que posibilitan la sobrevivencia de yemas que aseguran el rebrote (Malpassi, 2004) o con la presencia de órganos de reserva que facilitan la recuperación post- aplicación (Tuffi Santos *et al.*, 2004). La explicación de los mecanismos que inciden en dicha tolerancia podrá ayudar a comprender mejor como debe ser su manejo.

Entre los numerosos casos reportados de especies de malezas que han presentado algún inconveniente para su adecuado manejo se encuentran; *Parietaria debilis*, *Petunia axillaris* y *Verbena litoralis* que han sido citadas como malezas presentes en los sistemas de producción de soja en siembra directa en la provincia de Santa Fe, ya sea invadiendo los lotes o en aéreas adyacentes (Puricelli & Papa, 2006; Dellaferrera *et al.*, 2007, 2009; Faccini & Puricelli, 2007) .

Petunia axillaris (Lam.) Britton, Stern & Poggenb. (Steere) Cabrera (petunia silvestre) es una especie anual de ciclo invierno-primaveral (Dimitri, 1979), que se propaga por semillas, está adaptada a suelos no perturbados y se encuentra generalmente en barbechos, presenta tallos erectos, de 40-80 cm de altura; hojas inferiores alternas y las superiores opuestas, sus flores son solitarias, axilares y el fruto es una cápsula con numerosas semillas (Cabrera, 1967). Ha sido descrita como tolerante a dosis de glifosato de 2,5 l/ha de glifosato como sal isoproamilamina 48 (% p/v) al ser aplicado con una altura de planta de 20-30 cm (Faccini & Puricelli, 2007).

Parietaria debilis G Forst A. St.-Hil. (parietaria u ocucha) es una especie anual, que se propaga por semillas (Cabrera, 1967). Es considerada una especie con baja sensibilidad a glifosato y con tendencia a ser dominante en barbechos en situaciones de monocultivo de soja (Puricelli & Papa, 2006), es junto con *Commelina erecta* L., la especie más frecuentemente encontrada en estas situaciones (Papa & Carrancio, 2005). Esta especie tolera aplicaciones de 3 l/ha de glifosato (48%) + 500 cc de 2,4-D, con una altura de 10-25 cm (Faccini, 2000) o dosis de 2,5 l/ha. Además la aplicación de glifosato en barbecho la favorece al eliminar sus competidores, lo que permite que invada los lotes gracias a la alta producción de semillas provenientes de las zonas no tratadas adyacentes al cultivo (Puricelli & Papa, 2006). Ha cobrado importancia como maleza en Argentina desde la introducción de los cultivos resistentes a glifosato (Puricelli & Faccini, 2009).

Verbena litoralis Kunth es una especie anual de ciclo primavero-estival que se propaga por semillas. Está adaptada a suelos sin remoción, se la encuentra frecuentemente bajo los alambrados y en menor frecuencia en lotes de soja en siembra directa. Presenta tallos erguidos de hasta 2 m de altura, por lo común ramificados en la parte superior y hojas opuestas. Las flores se reúnen en espigas terminales (Burkart, 1979). Esta especie sobrevive, en estado reproductivo, aplicaciones de 3 l/ha de glifosato como sal triazolamina 48 (% p/v) + 500 ml/ha de 2,4-D formulado como éster 100 (% v/v) (Faccini & Puricelli, 2007).

El glifosato (N- fosfometil glicina) es un herbicida de amplio espectro, no selectivo, utilizado para el control efectivo de una extensa variedad de malezas (Arregui & Puricelli, 2008). Su eficacia depende de varios procesos que involucran una adecuada retención en la superficie foliar, su absorción y la translocación en la planta hasta el sitio

de acción donde debe producir la inhibición de la *5-enolpiruvilshikimato-3-fosfato* sintasa (EPSPs) (Kirkwood & Mckay, 1994; Monquero *et al.*, 2004b; Arregui & Puricelli, 2008). Es un inhibidor competitivo del ácido fosfoenolpiruvico (PEP), y ocupando su sitio de unión en la EPSPs, imitando un estadio intermediario del complejo enzima- sustrato ternario (Schönbrunn *et al.*, 2001).

Superficie foliar y absorción

La absorción del glifosato sucede en dos etapas: una penetración inicial rápida a través de la cutícula y una translocación simplástica lenta. La duración de este proceso depende de varios factores: la especie, la edad de la planta, las condiciones ambientales, la concentración del glifosato y el surfactante (Satchivi *et al.*, 2000).

Inicialmente el herbicida debe ser retenido en la superficie foliar para luego ser absorbido. Esta capacidad de retención y posterior absorción del herbicida puede ser relacionada en primera instancia con la proporción de estomas, tricomas y glándulas presentes en la epidermis foliar que produce variaciones en la morfología de la superficie foliar (Monquero, 2003). Estos componentes de la epidermis varían en forma y cantidad en función de la especie (Esau, 1982). La densidad de estomas, tricomas y glándulas presentes en la epidermis foliar produce variaciones en la morfología de la superficie foliar que se relacionan con la absorción diferencial de herbicidas (Wanamarta & Penner, 1989; Monquero *et al.*, 2004a) En distintas poblaciones de *Brassica juncea* (Huangfu *et al.*, 2009) encontraron una correlación positiva entre el número de tricomas y la menor sensibilidad al glifosato, sin embargo en estas especies no se pudo correlacionar de manera significativa la cantidad de ceras epicuticulares con la distinta sensibilidad.

Luego de una adecuada retención foliar, y debido a su comportamiento hidrofílico, la barrera que debe vencer el glifosato para su absorción es la cutícula, conformada por ceras epicuticulares y cuticulares, y por consiguiente, de naturaleza hidrofóbica (García-Torres & Fernández-Quintanilla, 1989). Las tasas de absorción foliar y, consecuentemente, la eficacia biológica de la aplicación de herbicidas es afectada en gran medida por la morfología y composición química de la superficie foliar y por la permeabilidad de la cutícula de los cultivos y de las malezas (Baker, 1982).

La cutícula es una capa lipídica extracelular, un biopoliéster insoluble en agua con elevado grado de entrecruzamiento entre los ácidos grasos hidroxilados de cadena larga y posee un espesor que oscila entre 0,5 y 15 μm . Está formada de adentro hacia fuera por: a) una capa de sustancias pécticas; b) una región que contiene cutina y además puede contener celulosa; c) una zona más externa (cutícula propiamente dicha) que contiene cutina y ceras (ceras intracuticulares) y carece de compuestos típicos de la pared celular; y d) una capa de ceras epicuticulares que se encuentra sobre la cutícula propiamente dicha. Estas últimas pueden ser depositadas en una variedad de formas: película fina, placas o cristales (gránulos, bastones, túbulos, costras, agregados, etc.) (Barthlott *et al.*, 1998), existiendo un paralelismo entre la diversidad de formas y la composición química (Koch & Ensikat, 2008).

La estructura y composición química de la cutícula muestra variaciones entre las diferentes especies y dentro de una especie determinada, varía además en función de la edad de la hoja. A medida que aumenta la edad existe un incremento en la deposición de los diferentes compuestos químicos de la cutícula provocando una reducción en la absorción de compuestos por la hoja (Hull *et al.*, 1975).

En algunas especies se encontró que la mayor tolerancia a los herbicidas era consecuencia de una mayor cantidad de ceras superficiales, las que bloqueaban la

absorción. La remoción de estas ceras con cloroformo incrementó la absorción de glifosato en plantas de coca (*Erythroxylum coca* var. *coca* (Lam.)) comparada con individuos con las ceras epicuticulares presentes (Ferreira & Reddy, 2000). Además de la cantidad de ceras también es de fundamental importancia su composición, ya que sus componentes le otorgan un carácter más o menos hidrofóbico. En *Commelina benghalensis* L. se estableció que el principal mecanismo de tolerancia al glifosato fue la absorción diferencial relacionada con características de las ceras epicuticulares, y la presencia de un metabolismo diferencial (Monquero *et al.*, 2004a).

Translocación del glifosato

Una vez que atravesó la cutícula el glifosato debe pasar por la pared celular, la plasmalema y el protoplasto de las células epidérmicas, atravesar la pared y plasmalema de los tejidos clorofilianos subepidérmicos, para llegar luego al floema en el que ocurrirá su translocación simplástica hasta los sitios de acción (Satchivi *et al.*, 2000). El movimiento del glifosato por el floema sigue la misma ruta que los fotosintatos desde hojas fotosintéticamente activas hacia los lugares de la planta que los utilizan (raíces, tubérculos, rizomas, hojas jóvenes y regiones meristemáticas). Es por esto que las condiciones que benefician la fotosíntesis favorecen también la acción del glifosato (Della-Cioppa *et al.*, 1986).

No se sabe exactamente cómo se mueve glifosato en el floema. El herbicida debe entrar en el protoplasto de las células del floema, presumiblemente por vía simplástica. El glifosato puede hacer esto ya sea por difusión masal en las células del mesófilo, seguido por el movimiento hacia el floema a través de los plasmodesmos, o puede ser tomado activamente en el mesófilo o en células acompañantes a través de un transportador fosfato. Una vez que el glifosato entra en el elemento criboso, queda

atrapado debido a sus propiedades hidrófilas y es transportado hacia los tejidos destino (Shaner, 2009).

En varias especies de malezas la causa de resistencia a glifosato parece ser una translocación reducida hacia los meristemas. El patrón de movimiento del glifosato difiere entre biotipos susceptibles y resistentes: se transloca menos en los biotipos resistentes, lo cual determina diferencias de 3 a 10 veces en las concentraciones que inhiben el 50 % del crecimiento (GR50). Este mecanismo se ha identificado en biotipos de *Conyza canadensis* (L.) Cronquist (Feng *et al.*, 2004) *Conyza bonariensis* (L.) Cronquist (Dinelli *et al.*, 2008), *Lolium multiflorum* Lam. (Perez-Jones *et al.*, 2007) y *Lolium rigidum* Gaudin (Wakelin *et al.*, 2004).

Se desconoce el mecanismo de reducción de la translocación del glifosato, pero el patrón de su movimiento y acumulación puede ayudar a identificarlo (Gomez de Enciso, 2009).

Forma de crecimiento

Son varios los autores que consideran que la investigación básica sobre aspectos de biología y ecología de las especie, y de las relaciones maleza-cultivo, pueden proveer información importante sobre las razones de la presencia de malezas (Malpassi, 2004; Storkey, 2004; Panigo *et al.*, 2012), contribuyendo al hallazgo de las estrategias adecuadas para su control (Radosevich *et al.*, 2007).

En este sentido, los estudios sobre la morfología del desarrollo de una especie en el espacio y en el tiempo tienen implicancias ecológicas y de manejo agronómico importantes (Meusel *et al.*, 1977; Montenegro & Ginocchio, 1992; Perreta, 2004) dado que permiten estudiar la competencia intra e interespecífica, o las relaciones entre las plantas y la luz, agua o nutrientes (De Reffye & Houllier, 1997; Tourn *et al.*, 1999);

desarrollar nuevas herramientas en la toma de decisiones para el manejo, la gestión, o conservación de especies (Meusel *et al.*, 1977; Montenegro & Ginocchio, 1992; Grosfeld, 2002); conocer e interpretar la capacidad de invasión de una especie (Perreta & Vegetti, 2004; Perreta *et al.*, 2011); estimar las condiciones óptimas para obtener determinados tamaños de plantas y evaluar las respuestas poblacionales a perturbaciones (Jeannoda-Robinson, 1977), entre otras.

Una planta que sobrevive a la acción de un herbicida modifica su comportamiento debido principalmente a la acción ejercida por el herbicida sobre los meristemas (Meusel *et al.* 1977), variando su respuesta fisiológica y redirigiendo el crecimiento a meristemas remanentes (Malpassi, 2005; Panigo *et al.*, 2012), lo cual se verá reflejado en la estructura de la planta. Otra característica de la planta que se puede alterar por acción de los herbicidas es la anatomía de sus órganos. Estas alteraciones usualmente reciben poca atención a pesar de la importancia de los efectos que se producen (Malpassi, 2005).

Por otra parte, una especie que sobrevive a la aplicación de un herbicida puede ser competitiva con el cultivo (Tardif *et al.*, 2006; Vila-Aiub *et al.*, 2009). Además es importante remarcar que la supervivencia de determinados biotipos podría generar problemas en el aumento de la tolerancia de la comunidad (Christoffoleti *et al.*, 2008), aunque no constituyan competencia para el cultivo.

La disposición espacio-temporal de los vástagos sobre el eje madre junto a las características morfológicas de dichos vástagos, constituye una de las mayores determinantes de la variación de la estructura del sistema de ramificación y, consecuentemente, de la forma de crecimiento de las especies (Mühlberg, 1970; Moore & Moser, 1995; Vegetti, 1997). La estructura no es más que la resultante del equilibrio entre los procesos endógenos y las acciones exteriores ejercidas por el ambiente

(Barthélémy, 2000), y se manifiesta por la disposición de los vástagos (Edelin, 1984). El estudio de las formas integradas a su ambiente permite un análisis completo del conjunto de caracteres vegetativos y reproductivos, que varían sólo dentro de un rango específico de plasticidad fenotípica (Dengler, 1994; Grosso, 2001). Este estudio de las formas a partir de principios dinámicos de construcción es inicialmente cualitativo, pero provee de información básica que permite la cuantificación (Barthélémy, 2000) y constituye una herramienta que posibilita esclarecer, como se mencionó en los párrafos anteriores, las distintas adaptaciones que presentan las especies en lo que concierne a la ocupación del espacio, competencia y resistencia a perturbaciones (Fournier, 1982; Barthélémy & Caraglio, 2007).

Existe buena cantidad de información sobre las dosis de herbicidas, combinaciones de herbicidas con diferentes mecanismos de acción y utilización de coadyuvantes para el control de nuevas malezas de soja (Monquero *et al.*, 2004a; Rainero, 2004; Puricelli & Faccini, 2005; Arregui *et al.*, 2006), sin embargo, para *Petunia axillaris*, *Parietaria debilis* y *Verbena litoralis* no se dispone de trabajos que hayan abordado el estudio de los mecanismos de tolerancia al glifosato.

Objetivos y estructura del trabajo

Las malezas invasoras de campos dedicados a la siembra directa con aplicaciones intensivas de glifosato se han constituido en un problema de creciente importancia, por lo que su estudio desde diferentes enfoques permitirá encontrar explicaciones a su comportamiento y posibles alternativas de solución. Este plan comprende la caracterización de los mecanismos de tolerancia al glifosato en *Petunia axillaris*, *Parietaria debilis* y *Verbena litoralis* abordando aspectos relacionados con la

llegada del herbicida a la planta, su translocación y su efecto tanto a nivel anatómico como exomorfológico.

Objetivo general

Caracterizar los mecanismos de tolerancia al herbicida glifosato en *Petunia axillaris*, *Parietaria debilis* y *Verbena litoralis*.

Objetivos específicos

a) Analizar la absorción del glifosato, así como los distintos factores que la afectan: espesor y aspecto de la cutícula foliar, y composición química de las ceras epicuticulares.

b) Describir el daño producido por glifosato en la anatomía foliar de las especies bajo estudio.

c) Determinar la translocación del glifosato.

d) Estudiar la forma de crecimiento determinando las características estructurales que facilitan la recuperación de la estructura aérea de estas especies y su reproducción.

Con el fin de abordar los objetivos mencionados, el presente trabajo se organiza de la siguiente manera:

- En el Capítulo 1 se analiza la sensibilidad diferencial a glifosato de *Petunia axillaris*, *Parietaria debilis* y *Verbena litoralis*, las cuales son analizadas en función de una especie sensible (*Amaranthus hybridus*), a través de ensayos dosis-respuesta. Se determina además el grado de inhibición del sitio de acción mediante una medición de ácido shikímico acumulado para las cuatro especies.

- El Capítulo 2 comprende el estudio de los mecanismos involucrados en la llegada del glifosato al sitio de acción, por lo que abarca estudios sobre la retención foliar, la absorción y translocación del herbicida, para lo cual se trabajó con herbicida radiomarcado.
- El Capítulo 3 aborda el estudio de las características anatómicas y de superficie foliar que pueden estar involucradas en las respuestas de tolerancia observadas en los Capítulos 1 y 2.
- El Capítulo 4 analiza las formas de crecimiento y el efecto que el herbicida tiene sobre ellas, incluye: la evaluación de los síntomas y del efecto desde una perspectiva estructural.
- Finalmente se discuten y analizan las implicancias de todos los resultados obtenidos.

Capítulo 1:

Sensibilidad diferencial y hormesis de las especies *Petunia axillaris*, *Parietaria debilis*, *Verbena litoralis* y *Amaranthus hybridus* al herbicida glifosato

Resumen

En este capítulo se evalúa la sensibilidad diferencial al glifosato de *Parietaria debilis*, *Petunia axillaris* y *Verbena litoralis* mediante ensayos de dosis-respuesta y a través de evaluación de la inhibición del sitio de acción mediante acumulación de ácido shikímico. También fueron evaluados los posibles efectos de hormesis a bajas dosis. La sensibilidad al glifosato en una planta puede ser medida por medio de la relación entre dosis aplicada y la reducción de la biomasa así como también mediante la medición de los efectos secundarios que produce, como ser la acumulación de ácido shikímico después de una aplicación. Además de las especies mencionadas se trabajó con una especie de conocida sensibilidad como es *Amaranthus hybridus*. Los análisis realizados permiten comprobar que tanto *Petunia axillaris* como *Parietaria debilis* son especies tolerantes al glifosato y que la aplicación de glifosato estimula el crecimiento, a dosis normalmente letales para especies susceptibles, sólo en *Parietaria debilis*. Se confirma la inhibición de la ruta metabólica del ácido shikímico en *A. hybridus* y *V. litoralis* mientras que la misma no se ve alterada en *Petunia axillaris* y en *Parietaria debilis*, indicando ser un método de caracterización de la tolerancia de las especies de malezas al herbicida glifosato.

Introducción

Las especies de malezas pueden persistir luego de la correcta aplicación de un herbicida postemergente por diversos motivos, como ser emergencias posteriores a la aplicación, presentar varios períodos de emergencia (Scursoni & Satorre, 2010), variaciones en el estado de desarrollo al momento de la aplicación (Faccini & Puricelli, 2007; González-Torralva *et al.*, 2010). También existen malezas con baja sensibilidad a la acción del herbicida. Entre estas últimas, se diferencian las especies tolerantes, las que poseen esta habilidad de forma innata, y las poblaciones resistentes, las cuales son biotipos dentro de ciertas especies, que han adquirido esta característica de baja

sensibilidad al herbicida por una variabilidad genética natural y consecuentemente son seleccionadas dentro de una población originalmente sensible al herbicida debido su aplicación recurrente (Herbicide Resistant Plants Committee, 1998).

La introducción de cultivos resistentes a herbicidas, principalmente al glifosato, y la siembra directa son los factores principales causantes del cambio producido en las especies de comunidades de malezas (Cerdeira *et al.*, 2011). Los actuales sistemas de producción de soja han generado una presión de selección que ha provocado el aumento de la importancia relativa de ciertas especies (Vitta *et al.*, 2004). Este proceso de selección es el mismo que se produce a nivel intra-específico en las especies resistentes (Christoffoleti *et al.*, 2008).

Dentro de las especies citadas como tolerantes en los sistemas de producción de soja actuales en Argentina están *Parietaria debilis* G Forst., *Petunia axillaris* (Lam.) Britton, Stern & Poggenb. y *Verbena litoralis* Kunth entre otras, mientras que *Amaranthus hybridus* L. por el contrario es una especie que ha perdido importancia en los sistemas de producción debido a su conocida susceptibilidad al glifosato (Vitta *et al.*, 2000).

En relevamientos realizados entre los años 2005 y 2008 *Petunia axillaris*, *Verbena litoralis* y *Parietaria debilis* se encontraban invadiendo gran parte de lotes dedicados a soja en siembra directa en la provincia de Santa Fe (Puricelli & Papa, 2006; Dellaferrera *et al.*, 2007, 2009). *Petunia axillaris* mostró un alto grado de tolerancia a glifosato con dosis de 5 l.ha⁻¹. Con dosis normales de uso solo alcanzó el 40% de control, requiriéndose dosis de 10 l.ha⁻¹ para lograr control del 90% (Trejo & Sobrero, 2012); *V. litoralis* y *Parietaria debilis* sobreviven a aplicaciones de 3 L/ha de glifosato como sal triazolamina 48 (% p/v) + 500 mL/ha de 2,4-D formulado como ester 100 (% v/v) (Faccini & Puricelli, 2006). La sensibilidad de *Parietaria debilis*, además no varía

según el estado de desarrollo, mostrando similares reducciones de biomasa en estado vegetativo y reproductivo (Puricelli & Faccini, 2009).

La importancia de la dosis fue reconocida ya en el siglo XVI por un alquimista alemán Theophrastus Bombastus von Hohenheim (1493 – 1541) quien se hacía llamar Paracelsus, éste sugirió que lo venenosa que pueda ser una sustancia dependía de la dosis [“Alle Ding’ sind Gifft, und nichts ohn’ Gifft; allein die Dosis macht das ein Ding kein Gifft ist.” (Todas las cosas son y no son veneno; la dosis hace al veneno)] (Klonowski, 1999). La relación entre la dosis de un herbicida y el efecto que produce sobre la planta es de fundamental importancia para la comprensión de la eficacia y el modo de acción del mismo (Seefeldt *et al.*, 1995). Los mismos autores indican cuáles ensayos de dosis-respuesta son los más utilizados para representar esa relación. En la construcción de estos modelos, cuando la variación del peso, seco o fresco, de la planta es graficado en función del logaritmo de la dosis de herbicida utilizada generalmente se obtiene una curva sigmoidea característica de un modelo logístico, donde el límite superior representará el testigo sin aplicación de herbicida y en el límite inferior el efecto debería ser máximo. De esta forma, la selectividad y eficacia de un herbicida puede ser evaluada comparando sus respectivas curvas de dosis-respuesta (Streibig & Kudsk, 1993; Cabanne *et al.*, 1999).

El parámetro más utilizado para la comparación entre los ensayos de dosis-respuestas es la dosis letal media (DL_{50}) (Streibig, 1988), la cual indica la dosis necesaria para producir el 50 % del efecto. Normalmente la DL_{50} es el mejor estimador posible de la sensibilidad de una planta a un herbicida y es útil para realizar comparaciones entre diferentes experimentos de dosis respuesta (Streibig & Kudsk, 1993)(Streibig, 1988). La comparación de las dosis que producen el mismo efecto,

responde a la pregunta de qué cantidad de determinado herbicida se debe aplicar para conseguir el mismo efecto (Ritz *et al.*, 2006).

Además del resultado típico dosis-respuesta descrita anteriormente, numerosos estudios han demostrado que a bajas dosis ciertas sustancias pueden estimular el crecimiento en un número amplio de especies, tanto en el laboratorio como en pruebas a campo, este efecto es conocido como hormesis (Belz & Cedergreen, 2010);. Dicho de otra manera, la hormesis sería un fenómeno de dosis-respuesta en el cual se observan efectos opuestos a bajas y altas dosis sobre el mismo parámetro (Calabrese & Blain, 2011). En estos casos una curva sigmoidea no puede predecir estos efectos producidos a bajas dosis para lo cual se utilizan modelos modificados que puedan representar dicho efecto, como ser el propuesto por Brain & Cousens (1989). Dentro de los herbicidas el glifosato es uno de los que produce este efecto a bajas dosis (Velini *et al.*, 2010) en algunas especies como maíz y soja no transgénicos, cebada, *Commelina benghalensis* L., *Eucalyptus grandis* W. Hill ex Maiden y *Pinnus caribea* L. (Velini *et al.*, 2008; Cedergreen & Olesen, 2010).

El glifosato N-(fosfonometil) glicina es el único herbicida que actúa en la 5-enolpiruvilshikimato fosfato sintasa (EPSPs) (Steinrücken & Amrhein, 1980; Herrmann & Weaver, 1999). Esta enzima forma parte importante en la ruta metabólica del ácido shikímico, y es en último término responsable de la biosíntesis de compuestos aromáticos como tirosina, fenilalanina y triptófano (Goodwin & Mercer, 1983). La inhibición de la EPSPs provoca una acumulación de ácido shikímico como producto de la reacción también inhibida (Duke, 2011). Mientras que la sensibilidad del glifosato en una planta puede ser medida como se describe en los párrafos anteriores, también puede medirse el grado de inhibición del sitio de acción mediante una medición de ácido shikímico acumulado después de una aplicación. Elevados valores de ácido shikímico

son indicadores de inhibición de la EPSPs por parte del glifosato, (Duke, 2011) y una medida indirecta del grado de sensibilidad de una especie al herbicida glifosato.

En este capítulo se evalúa la sensibilidad diferencial al glifosato de *Petunia axillaris*, *Parietaria debilis*, *Verbena litoralis* y *Amaranthus hybridus* mediante ensayos de dosis-respuesta y a través de evaluación de la inhibición del sitio de acción por acumulación de ácido shikímico. También fueron evaluados los posibles efectos de hormesis a bajas dosis en las mismas malezas.

Metodología

Material vegetal

Se cultivaron plantas de *Parietaria debilis*, *Petunia axillaris*, *Verbena litoralis* y *Amaranthus hybridus*. Las semillas de todos los individuos fueron colectadas de poblaciones de campos cultivados, en la región de Esperanza (31° 26'S - 60° 56'W). Los lotes de donde fueron coleccionadas las semillas tenían como principal cultivo a la soja, para el manejo se realizaban barbechos y controles de malezas post emergentes con glifosato como principal herbicida. Todas las semillas germinaron sobre papel de filtro húmedo dentro de placas Petri, las plantas fueron trasplantadas a macetas (una planta por maceta) que contenían una mezcla de turba y tierra (1:2 v/v) en sala de crecimiento a una temperatura de 28/18°C (día/noche) con un fotoperíodo de 16 h y una intensidad lumínica de 500 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ con 60 – 80 % de humedad relativa.

Ensayos de dosis-respuesta

Se aplicaron en estadio 1,4 a 1,5 según la escala fenológica BBCH (cuatro a cinco nudos desarrollados) (Hess *et al.*, 1997) dosis crecientes de glifosato para *Amaranthus hybridus*: 0, 25, 50, 100, 200 y 400 g i.a.ha⁻¹; para las restantes especies: 0, 25, 50, 100, 200, 400, 800, y 1600 g i.a. ha⁻¹.

El glifosato utilizado estaba formulado como Roundup® Power (sal isopropanilamina 48% p/v). Todas las aplicaciones se realizaron con una cámara de asperjado de laboratorio equipada con pastillas de abanico plano teejet 8001, calibradas para asperjar 200 L ha⁻¹ a una presión de 275 kPa.

Por maceta se determinó el peso fresco de la parte aérea de la planta a los 21 días post aplicación. Estos pesos fueron expresados como porcentaje del testigo sin tratar. Los datos por especie fueron ajustados a un modelo logístico de 3 parámetros representado por la formula 1 utilizando el programa estadístico “R” con “drc plug-in” (Ritz & Streibig, 2005; Knezevic *et al.*, 2007), donde el parámetro e representa la dosis que produce una respuesta media entre d que representa el límite superior, y c que representa el límite inferior de la curva y está ajustado en 0. El parámetro b marca la inflexión alrededor de e (Streibig & Kudsk, 1993).

$$(y) = c + (d - c) / (1 + \exp(b(\log x - \log e))) \quad (1)$$

Se determinó para cada especie la dosis de herbicida que inhibe el crecimiento en un 50% respecto al control sin tratar (ED₅₀). El factor de tolerancia se calculó como: ED₅₀ (tolerante)/ED₅₀ (*A. hybridus*) e indica la multiplicación de la dosis en la especie tolerante necesaria para producir el mismo efecto que en la especie sensible. También fue calculado el factor de tolerancia entre *Parietaria debilis* y *Petunia axillaris*.

Para evaluar el efecto de hormesis se utilizó el modelo de (Brain & Cousens, 1989): $(y) = c + (d - c + fx) / (1 + \exp(b(\log x - \log e)))$, donde se agrega la variable $f(x)$ la cual predice el efecto de estimulación del crecimiento a bajas dosis; c y d son las asíntotas inferior y superior respectivamente, b y e son parámetros sin interpretación directa y f representa un medida de la hormesis (valores mayores a 0 representan hormesis).

La especie *V. litoralis* no fue incluida en los resultados de este ensayo pues las dosis menores producían un control total de la especie para las condiciones planteadas.

Acumulación de ácido shikímico (skm)

Individuos de las cuatro especies citadas, en las mismas condiciones de crecimiento descritas anteriormente fueron asperjados con una solución de glifosato que contenía 100 g i.a. ha⁻¹ bajo las mismas condiciones mencionadas en el ensayo previo. Las últimas hojas expandidas de plantas de todas las especies fueron cosechadas para la extracción de ácido shikímico a las 24, 48, 72 y 96 horas luego de la aplicación. Los tejidos foliares (50 mg de peso fresco) fueron homogeneizados, y las muestras se congelaron a -40°C y posteriormente se siguió el protocolo descrito por Singh & Shaner (1998). La acumulación de ácido shikímico se midió ópticamente a 380 nm usando un espectrofotómetro Beckman DU-640. Las curvas estándar se determinaron usando plantas sin tratar y soluciones de concentración conocida de ácido shikímico.

Ambos experimentos fueron repetidos 3 veces con 10 replicas por tratamiento.

Resultados

Ensayos de dosis respuesta

La biomasa de la parte aérea de *Parietaria debilis*, *Petunia axillaris* y *A. hybridus* disminuye a medida que aumenta la dosis de herbicida (Fig. 1.1), pero particularmente la ED₅₀ difiere significativamente entre las especies siendo la más alta la de *Parietaria debilis* y la más baja la de *A. hybridus* (Tabla 1.1).

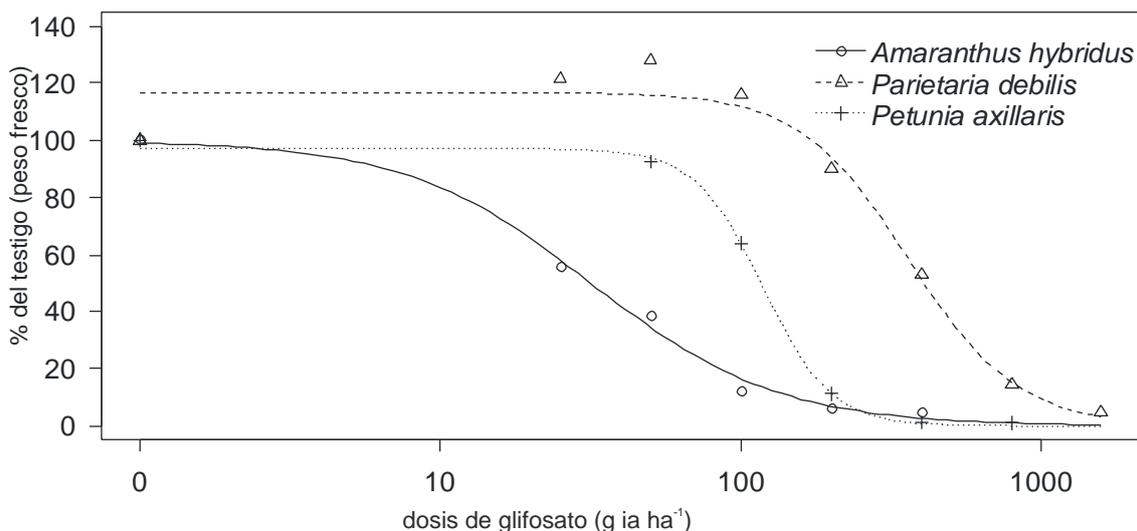


Figura 1.1: Curvas de dosis respuesta correspondientes a *Parietaria debilis*, *Petunia axillaris* y *Amaranthus hybridus*. El peso fresco de la parte aérea de las plantas fue determinado a los 21 días post aplicación de glifosato y está expresado como porcentaje del testigo sin tratar. Cada punto es la media de tres experimentos. Estas curvas fueron calculadas con el modelo propuesto por Streibig & Kudsk (1993).

Los parámetros de la regresión indican además que *A. hybridus* es menos sensible a la variación de dosis mientras que *Petunia axillaris* es la especie que más ha expresado esta variación de sensibilidad, esto queda cuantificado mediante el punto de inflexión alrededor de e (parámetro b de la regresión) (Tabla 1.1).

Por otra parte la biomasa acumulada en las tres especies también es diferente, siendo menor en *Parietaria debilis* (2,45 +/- 0,50 g/planta) y mayor en *Petunia axillaris* (4,67 +/- 0,80 g/planta). *A. hybridus* tuvo una acumulación de 4,63 +/- 0,28 g/planta ocupando una posición intermedia.

Tabla 1.1: Parámetros del modelo ajustado logístico (3 parámetros, ED_{50} como parámetro y límite inferior fijo en 0) usados para calcular la dosis requerida para una reducción de un 50% del peso fresco, el parámetro e corresponde a la ED_{50} los parámetros c , d y b fueron definidos en la fórmula 1.1, el valor de p es el nivel de probabilidad de significancia de cada factor para el modelo.

	Estimado	Error estandard	Probabilidad (valor de p)
b : <i>Amaranthus hybridus</i>	1,41	0,1095	<0,0001
b : <i>Parietaria debilis</i>	2,40	0,1623	<0,0001
b : <i>Petunia axillaris</i>	3,87	0,4827	<0,0001
d : <i>Amaranthus hybridus</i>	99,75	2,6360	<0,0001
d : <i>Parietaria debilis</i>	116,66	1,5217	<0,0001
d : <i>Petunia axillaris</i>	97,10	4,7048	<0,0001
e : <i>Amaranthus hybridus</i>	31,79	2,0094	<0,0001
e : <i>Parietaria debilis</i>	362,54	12,4374	<0,0001
e : <i>Petunia axillaris</i>	118,56	5,2309	<0,0001

Los factores de tolerancia calculados indican que *Parietaria debilis* y *Petunia axillaris* requieren respectivamente una dosis de herbicida 11,4 y 3,7 veces mayor que *Amaranthus hybridus* para producir el mismo efecto (Tabla 1.2.); además cuando se compara *Parietaria debilis* con *Petunia axillaris* se halla una diferencia significativa entre las especies, siendo *Parietaria debilis* 3,05 veces menos sensible que *Petunia axillaris* (Tabla 1.2).

Tabla 1.2: Comparación de los parámetros de ED₅₀ entre especies con sus respectivos errores estandar y valores de nivel de probabilidad de significancia de cada factor para el modelo.

Comparación del parámetro 'e' (ED ₅₀)	Estimado	Error estandar	Probabilidad (valor de p)
<i>Parietaria debilis</i> / <i>Amaranthus hybridus</i>	11,40	0,0063	<0,0001
<i>Petunia axillaris</i> / <i>Amaranthus hybridus</i>	3,73	0,0206	<0,0001
<i>Parietaria debilis</i> / <i>Petunia axillaris</i>	3,05	0,1709	<0,0001

Efecto de hormesis

Parietaria debilis posee claramente un efecto de estimulación del crecimiento, como puede ser observado en el factor f de la Tabla 1.3. En el máximo de estimulación, esta especie muestra una biomasa de su parte aérea que corresponde a un 120% del peso del testigo (Fig. 1.2), destacando que a la misma dosis en la que se observa y se calcula esta mayor estimulación, la planta sensible ha reducido su biomasa en más de un 80%.

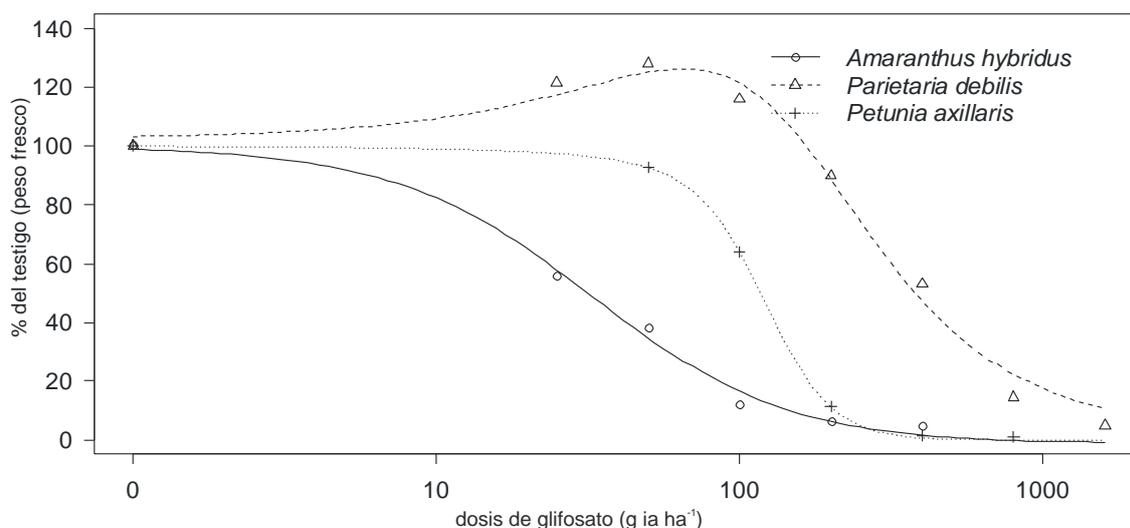


Figura 1.2: Curvas de dosis-respuesta correspondientes a *Parietaria debilis*, *Petunia axillaris* y *Amaranthus hybridus*. El peso fresco de la parte aérea de las plantas fue determinado a los 21 días post aplicación de glifosato y está expresado como porcentaje del testigo sin tratar. Cada punto es la media de tres experimentos. Estas curvas fueron ajustadas con el modelo de Brain & Cousens (1989).

Tabla 1.3: Parámetros del modelo ajustado Brain-Cousens (3 parámetros, límite inferior fijo en 0) el parámetro f representa una medida del nivel de hormesis, los parámetros b y e no tienen interpretación directa, p-value es el nivel de probabilidad de significancia de cada factor para el modelo.

	Estimado	Error estandard	Probabilidad (valor de p)
B: <i>Amaranthus hybridus</i>	2,74	1,333	0,0412
B: <i>Parietaria debilis</i>	1,75	0,147	0,0000
B: <i>Petunia axillaris</i>	4,00	1,911	0,0380
E: <i>Amaranthus hybridus</i>	31,87	20,306	0,1186
E: <i>Parietaria debilis</i>	43,37	12,303	0,0006
E: <i>Petunia axillaris</i>	81,19	19,688	0,0001
f: <i>Amaranthus hybridus</i>	NS		
f: <i>Parietaria debilis</i>	6,22	1,680	0,0003
f: <i>Petunia axillaris</i>	NS		

Acumulación de ácido shikímico

Luego de la aplicación de glifosato los niveles de ácido shikímico se incrementaron a medida que transcurría el tiempo (Figura 1.3), mientras que para *Parietaria debilis* y *Petunia axillaris* el aumento no fue significativo, llegando a valores máximos de 0,18 y 0,15 (mg sk/g hoja) respectivamente. En *A. hybridus* los valores alcanzaron 2,61 (mg sk/g hoja) indicando una inhibición mayor del sitio de acción; el comportamiento de *V. littoralis* es particular, mostrando un rápido incremento de ácido shikímico apenas a las 24 horas de la aplicación, con un pico 24 horas más tarde y luego reduciendo sus niveles pero sin llegar nunca a los típicos de una especie tolerante (Figura 1.3).

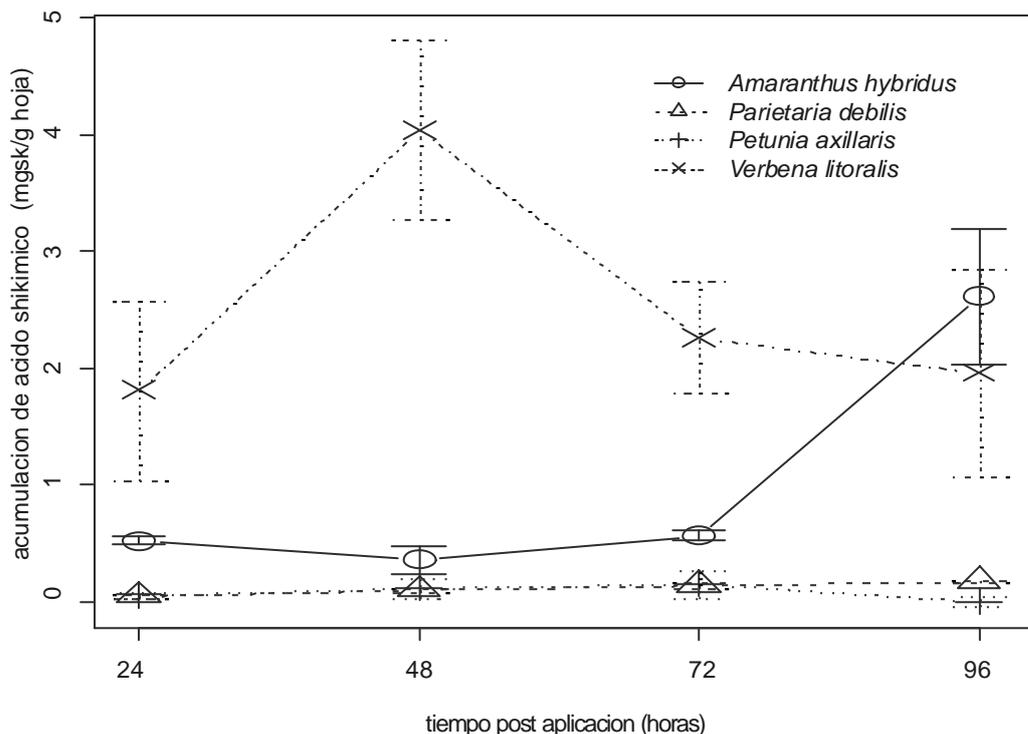


Figura 1.3: Ácido Shikimico acumulado en hojas de plantas de *Petunia axillaris*, *Parietaria debilis*, *Verbena litoralis* y *Amaranthus hybridus* luego de una aplicación de 100 g i.a. ha⁻¹. Las barras verticales representan los errores estándar de las medias.

Discusión

Las especies *Petunia axillaris* y *Parietaria debilis* ya habían sido caracterizadas como tolerantes al glifosato en estudios realizados a diferentes estadios de crecimiento y con formulaciones y formas de aplicación variables (Papa & Puricelli, 2003; Dellaferrera *et al.*, 2007, 2009; Faccini & Puricelli, 2007; Puricelli & Faccini, 2009). En el presente trabajo se confirma esta tolerancia y además se cuantifica el factor de tolerancia en función de una especie patrón de conocida sensibilidad. Por el contrario la especie *V. litoralis* considerada como tolerante en los trabajos de Faccini & Puricelli (2006) fue sensible en las condiciones utilizadas para este trabajo.

Estudios referidos a la sensibilidad al glifosato en otras especies tolerantes y resistentes se muestran en la tabla 1.4 donde se observa que los factores de tolerancia o resistencia abarcan un rango de 2,5 a 14,2 veces lo requerido para el control de la

respectiva especie sensible testigo; *Petunia axillaris* y *Parietaria debilis* se encuentran dentro de este rango.

Tabla 1.4: Valores de sensibilidad y acumulación de ácido shikímico para especies de malezas tolerantes o resistentes al glifosato.

Especie	Factor de resistencia o tolerancia	Acumulación de ácido shikímico (mg sk/g hoja)	Referencia
<i>Canavalis ensiformis</i>	7,7	+/- 0,5	Cruz-Hipolito <i>et al.</i> , 2009
<i>Conyza bonariensis</i>	2,9 – 5,6	9-14 veces mayor que la sensible	Dinelli <i>et al.</i> , 2008
<i>Mucuna pruriens</i> var <i>utilis</i>	7,44	+/- 0,5	Rojano-Delgado <i>et al.</i> , 2012
<i>Clitoria ternatea</i>	14,21	+/- 0,5	Cruz-Hipolito <i>et al.</i> , 2011
<i>Neonotonia wightii</i>	8,95	0,5-1,0	Cruz-Hipolito <i>et al.</i> , 2011
<i>Conyza bonariensis</i>	2,52/0,84		Feng <i>et al.</i> , 2004
<i>Conyza bonariensis</i>		6,9/0,59 (S/R)	Chodová <i>et al.</i> , 2009

A pesar de catalogar en diversos trabajos a ambas especies como tolerantes, la DL₅₀ estimada para las especies varía entre los distintos autores, principalmente debido a diferencias en el estado de crecimiento de cada planta en el momento de aplicación. Por ejemplo Puricelli & Faccini (2009) reportan valores de 1393 g i.a. ha⁻¹ para *Parietaria debilis* con dos meses de crecimiento, siendo esta dosis más de 3 veces mayor a la calculada en este trabajo, sin embargo para *A. hybridus* los valores de DL50 calculados por Cruz-Hypolito *et al* (2009, 2011) son 40,93 y 42,22 g i.a. ha⁻¹ muy similares a los obtenidos en este trabajo no existiendo diferencias, probablemente porque las metodologías para su cálculo son más aproximadas a las utilizadas.

Contrapuesto al efecto inhibitorio que produce el glifosato a dosis normales, a bajas dosis puede también producir una estimulación del crecimiento, esto ha sido observado por varios autores (Cedergreen *et al.*, 2006; Velini *et al.*, 2008, 2010; Cedergreen & Olesen, 2010; Belz & Cedergreen, 2010). El concepto de hormesis, un fenómeno dependiente de la dosis, caracterizado por la inhibición del crecimiento a altas dosis y el estímulo a dosis bajas, está recibiendo una especial importancia en biología vegetal. Tal fenómeno es descrito como predecible y reproducible por

(Calabrese, 2008), mientras que Belz & Cedergreen (2010) son más reservados al respecto e indican que la hormesis producida por factores químicos tiene limitada sus aplicaciones debido a la falta de predictibilidad de sus efectos. Vellini *et al* (2008) describe efectos estimulatorios en soja no transgénica, maíz, *Commelina benghalensis*, *Eucaliptus grandis* y *Pinus caribea* cuando se aplican dosis entre 1,8 y 36,0 g i.a. ha⁻¹. Estas bajas dosis indicadas para los casos de hormesis pueden darse efectivamente en condiciones de campo sobre ciertas plantas que reciben el asperjado de manera incorrecta, ya sea por el movimiento vertical o lateral de los picos o bien por estar cubiertas por rastrojo, el cultivo u otras plantas (Souza *et al.*, 2007). También la dosis puede verse reducida por ocurrir un lavado del asperjado debido a lluvias al poco tiempo de la aplicación. En *Parietaria debilis* el efecto de estimulación se produce a dosis mayores que las indicadas para las especies antes descritas. Sin embargo, es importante considerar que el rango de dosis y la amplitud de las respuestas no sólo varía en función de cada una de las especies sino que también depende del estadio de crecimiento dentro de una misma especies (Vellini *et al.*, 2008).

Desde el punto de vista agrícola, un efecto estimulatorio en plantas cultivadas posee el potencial para incrementar la producción y la calidad de lo cosechado (Vellini *et al.*, 2008), de hecho en caña de azúcar, el glifosato es utilizado a bajas dosis para promover la acumulación de sacarosa. El mecanismo por el cual se produce este efecto aun no está del todo claro, aunque puede especularse con que si la síntesis de lignina es dependiente de la ruta del ácido shikímico, las bajas dosis de glifosato podrían inhibir la lignificación lo suficiente como para permitir que una mayor cantidad de carbono sea particionado a la producción de sacarosa (Vellini *et al.*, 2008). Para el caso de *Parietaria debilis*, en el que la concentración necesaria para producir una estimulación del crecimiento podría efectivamente lograrse a campo, brindaría a la especie de una

ventaja competitiva respecto a otras que a la misma dosis presentan una inhibición del crecimiento.

La inhibición de la EPSPs tiene como consecuencia la acumulación de ácido shikímico; esta respuesta puede usarse como indicador de la sensibilidad de una especie a la exposición del glifosato (Vellini *et al.*, 2008); comparativamente, las especies con baja acumulación de ácido shikímico requieren mayores dosis de glifosato para su control (Feng *et al.*, 2004). Al igual que otras especies tolerantes (Tabla 1.4) las plantas de *Parietaria debilis* y *Petunia axillaris* tratadas con glifosato no incrementan su concentración de ácido shikímico en comparación con el testigo manteniéndose en valores cercanos a los 0,5 (mg sk/g hoja); lo que confirma que no existe una inhibición de la ruta metabólica aun al mayor tiempo evaluado. Mientras que *A. hybridus*, por el contrario, acumula ácido shikímico hasta 2,6 (mg sk/g hoja) por encima del testigo lo que claramente indica que la ruta se halla inhibida, un comportamiento similar fue reportado para la misma especie por (Cruz-Hipolito *et al.*, 2011).

La composición y la abundancia de las poblaciones de malezas a menudo cambia en respuesta a las prácticas de manejo (Culpepper, 2006). En los sistemas de cultivo basados en la utilización de glifosato como herbicida los investigadores concluyen que ocurren cambios en las poblaciones de malezas (Culpepper, 2006). Varios autores remarcan que las poblaciones de malezas están asociadas al cultivo, la aplicación de un nuevo sistema de manejo de malezas resultará en un cambio en las poblaciones de las especies presentes; y este cambio favorecerá la permanencia de las especies menos sensibles a ser controladas con este nuevo método adoptado, esto es cierto tanto para métodos de control químicos y no químicos (Webster *et al.*, 2006). Los

cambios en el control químico generan respuestas más rápidas de erradicación de poblaciones susceptibles y de selección por tanto, de poblaciones menos sensibles (Shaner, 2000). Las investigaciones sobre el potencial de cambio en las poblaciones de malezas en cultivos resistentes al glifosato con programas de manejo de malezas basados en este herbicida, son sin embargo muy limitadas, a pesar de que estos cambios conllevan incrementos en los costos de los productores (Culpepper, 2006). Por otra parte, este fenómeno de cambio poblacional no es solo inter- si no también intraespecífico; Acosta (2012) muestra que poblaciones de *Gomphrena perennis* provenientes de campos cultivados comparadas con otras provenientes de zonas silvestres muestran una susceptibilidad menor al glifosato, posiblemente debido a una adaptación a sistemas agrícolas. En consecuencia las poblaciones sometidas a un control químico reiterado serán seleccionadas para obtener subpoblaciones cada vez menos sensibles a este manejo. Por tanto es probable que si comparamos entre las especies estudiadas, *Parietaria debilis* aumente su presencia en campos agrícolas seguida por *Petunia axillaris*, mientras que *V. litoralis* y *A. hybridus* disminuyan su presencia en los sistemas agrícolas cuyo control de malezas se realice en base a controles químicos con glifosato.

Conclusión

Los análisis realizados permiten comprobar que tanto *Petunia axillaris* como *Parietaria debilis* son especies tolerantes a glifosato mientras que *Verbena litoralis* es una especie sensible al mismo bajo las condiciones utilizadas en este trabajo.

El glifosato en *Parietaria debilis* posee un efecto de estimulación de crecimiento a dosis normalmente letales para especies susceptibles al glifosato.

Se confirma la inhibición de la ruta metabólica del ácido shikímico en *A. hybridus* y *V. litoralis* mientras que la misma no se ve alterada en *Petunia axillaris* y en *Parietaria debilis*, lo que indica que es un método de caracterización de la tolerancia de las especies de malezas al herbicida glifosato

Capítulo 2:

Retención, absorción y translocación de glifosato

Resumen

La eficacia del glifosato como herbicida depende de una adecuada retención foliar, una absorción por parte del vegetal y una translocación del principio activo hacia su sitio de acción, la alteración de estos mecanismos es responsable en mayor o menor medida de la tolerancia al glifosato en varias especies de malezas. En este capítulo se evalúa la retención foliar del herbicida y mediante glifosato radiomarcado, la absorción y translocación del mismo en *Petunia axillaris*, *Parietaria debilis* y *Amaranthus hibrydus*. Para la especie *Verbena litoralis* sólo se evaluó retención foliar debido a la alta sensibilidad a glifosato que presentó.

La retención foliar del herbicida muestra diferencias significativas entre las especies, siendo *Parietaria debilis* y *Petunia axillaris* las que menor cantidad de herbicida retienen. La absorción y la translocación también mostraron diferencias entre las especies, siendo en el último caso no sólo en magnitud sino también en los órganos hacia los cuales se movió el herbicida.

Sólo en *Parietaria debilis* se puede correlacionar su menor susceptibilidad con una reducida absorción y limitada translocación del herbicida, mientras que en *Petunia axillaris* la menor sensibilidad al glifosato podría estar relacionada con un mayor tiempo de ingreso y movimiento del herbicida, y una distribución preferencial del glifosato hacia los meristemas.

Introducción

La eficacia del glifosato como herbicida está dada por su habilidad de translocarse en la planta hacia meristemas apicales de los vástagos y raíces; y hacia los órganos de reserva de plantas perennes (Shaner, 2009). Sin embargo, esta efectividad depende de una serie de mecanismos que involucran la adecuada retención foliar, absorción y translocación a través de la planta para que se logre una adecuada concentración de principio activo en el sitio de acción, que sea capaz de inhibir la 5-

enolpiruvilshikimato-3-fosfato sintasa (EPSPs) (Kirkwood & McKay, 1994). Esta inhibición previene la síntesis de aminoácidos aromáticos requeridos para formación de proteínas (Steinrücken & Amrhein, 1980).

En la retención del herbicida influye la naturaleza de la superficie foliar. Los cristales formados por las ceras epicuticulares forman superficies microestructuradas hidrofóbicas que afectan la mojabilidad de la hoja (Barthlott & Neinhuis, 1997). Además influyen otras propiedades físicas de las hojas, como la rugosidad de la superficie foliar y del herbicida, o el tamaño de la gota al aplicar (García-Torres & Fernández- Quintanilla, 1989). Una menor retención ha sido correlacionada con una menor susceptibilidad a glifosato en el género *Conyza* (González-Torralva *et al.*, 2010).

Debido al comportamiento hidrofílico del glifosato, la primera barrera foliar que debe vencer para su absorción es la cutícula (Monquero *et al.*, 2004a). Luego, la penetración del glifosato a través de la cutícula es lenta y en general las formulaciones comerciales se valen de adyuvantes para mejorarla (Bariuan *et al.*, 1999). La concentración externa y la velocidad de movimiento desde la superficie interna de la cutícula hacia el apoplasto afectan la velocidad de penetración del herbicida (Caseley, 1996).

La absorción foliar de herbicidas ha sido estudiada intensamente por muchos años, existiendo numerosos trabajos sobre combinaciones de herbicidas y plantas, donde a menudo se evalúan adyuvantes con el fin de determinar si esta absorción es un mecanismo que puede afectar la sensibilidad diferencial a determinado herbicida (Kniss *et al.*, 2011). La disminución de la absorción celular del glifosato podría ocurrir por uno de estos cuatro mecanismos: 1, inhibición de la absorción activa por modificación del transportador; 2, presencia de un transportador activo que bombea el glifosato hacia la vacuola, secuestrándolo dentro de la célula; 3, presencia de un transportador que

bombea al glifosato del interior de la célula hacia el apoplasto; y 4, inhibición de la absorción del glifosato por el cloroplasto mediante un transportador activo el cual bombea al herbicida fuera del cloroplasto (Shaner, 2009).

Luego de su absorción, el glifosato se transloca del floema de las hojas a los tejidos que actúan como destinos siguiendo el movimiento de la sacarosa (Gougler & Geiger, 1981; McAllister & Haderlie, 1985). Debido a sus propiedades hidrofílicas el glifosato entra en los elementos cribosos y es transportado a los tejidos en activo crecimiento. Su movilidad dentro del floema se debe a su exclusiva combinación de tres funciones ácidas y una básica (Bromilow & Chamberlain, 2000). Sin embargo, no se conoce con exactitud cómo ocurre ese movimiento, se presume que el herbicida entra en el floema via simplasto lo que puede ocurrir por difusión de masas, seguido por un movimiento a través de los plasmodesmos. Puede también ser tomado activamente hacia las células del mesófilo o hacia las células acompañantes a través de un transportador fosfato (Shaner, 2009).

La resistencia al glifosato ha sido adquirida en numerosas especies de malezas, siendo el mecanismo más citado como causante de la misma la limitada translocación hacia los meristemas (Shaner, 2009). En ninguno de los casos conocidos de malezas resistentes al glifosato se ha encontrado que la degradación metabólica constituya un rol fundamental en el desarrollo de tal resistencia (Duke, 2011). La mayoría de los trabajos que describen mecanismos de tolerancia al glifosato encontraron, al igual que para los casos de resistencia, alteraciones en la absorción y translocación del herbicida (Monquero *et al.*, 2004b; Cruz-Hipolito *et al.*, 2009, 2011), existen limitados casos en los que otros mecanismos intervienen, como ser el metabolismo diferencial del herbicida (Rojano-Delgado *et al.*, 2012).

En biotipos susceptibles el glifosato se mueve primero hacia arriba con la corriente de transpiración, luego pasa a las venas menores y sale de las hojas tratadas hacia el resto de la planta. En biotipos resistentes el glifosato se mueve hacia arriba en la corriente transpiratoria pero no llega a las venas menores, por lo que se transloca menos herbicida desde la hoja tratada (Shaner, 2009). No se conoce el mecanismo de reducción de la translocación del glifosato, pero el patrón de su movimiento y acumulación puede ayudar a identificarlo (Gómez De Enciso, 2009). Sin embargo, los estudios actuales en estos aspectos que definen mecanismos de tolerancia, son limitados (Owen, 2008). En este capítulo se analiza la retención foliar, la absorción y la translocación de glifosato en *Petunia axillaris*, *Amaranthus hybridus*, *Verbena litoralis* y *Parietaria debilis* a fin de determinar si contribuyen a la menor susceptibilidad al glifosato en estas especies.

Metodología

Material vegetal

Se cultivaron plantas de *Parietaria debilis*, *Petunia axillaris*, *Verbena litoralis* y *Amaranthus hybridus*, esta última como control sensible. Las semillas de todos los individuos fueron colectadas de poblaciones de campos cultivados en la ciudad de Esperanza (31° 26'S and 60° 56'W). Todas las semillas germinaron en papel de filtro húmedo dentro de placas de Petri, luego las plantas fueron trasplantadas a macetas (una planta por maceta) que contenían una mezcla de turba y tierra (1:2 v/v) en sala de crecimiento a una temperatura de 28/18°C (día y noche) con un fotoperíodo de 16 h y una intensidad lumínica de 500 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ con 60 – 80 % de humedad relativa.

Retención foliar del herbicida

Para este ensayo se siguió la metodología propuesta por Gauvrit (2003) en la que individuos de todas las especies al estadio BBCH 1,3 a 1,4 (tres a cuatro nudos desarrollados; (Hess *et al.*, 1997)) fueron asperjados con una solución coloreada de glifosato mediante un aplicador de laboratorio. La solución con la que se realizó el tratamiento contenía el equivalente a 100 g ia ha⁻¹ en 200 l H₂O y 100 mg l⁻¹ de Na-Fluoresceína. Luego de que la solución asperjada se secase sobre el follaje se cortaron las plantas a nivel del suelo y se sumergieron en 50 ml de NaOH 5 mM por 30 s. Esta solución fue medida mediante espectrofluorímetro a 490/510 nm. Se construyó además una curva de calibración midiendo concentraciones conocidas de glifosato – fluoresceína – NaOH. El resto de planta se secó en estufa a 65°C por 72 h y luego fue pesada. Finalmente la retención del herbicida fue expresada en función del peso seco.

El experimento fue repetido 4 veces (cuatro plantas por repetición) y se usó el test de t para evaluar diferencias entre cada especie tolerante y la especie sensible.

Absorción y translocación de [¹⁴C]glifosato

Debido a que la especie *Verbena litoralis* senesció con la dosis mínima de herbicida y acumuló ácido shikímico como una especie sensible (Capítulo 1), no fue utilizada para los ensayos de absorción y translocación, por tanto se utilizaron para esta sección solo individuos de *Parietaria debilis*, *Petunia axillaris* y *Amaranthus hybridus*.

Para ambos estudios se utilizó [¹⁴C] glifosato y glifosato comercial para preparar una solución final con una actividad de 0,834 kBq μL⁻¹ y una concentración de 0,5 g ia l⁻¹ (100 g ia ha⁻¹ en 200 l). La solución herbicida radiomarcada se aplicó en gotas de 1 μL en la cara adaxial de la última hoja expandida de cada individuo mediante una micropipeta (LabMate + HTL) aplicándose un total de 0,834 kBq por planta.

A las 24, 48, 72 y 96 horas post aplicación se extrajo un grupo de 5 plantas, cada una fue dividida en hoja tratada, raíz y resto de planta, el [^{14}C] glifosato no absorbido fue lavado de la hoja tratada con 3 ml de acetona – agua (1:1 v/v), esta solución de lavado fue mezclada con 12 ml de líquido para contador de centelleo y analizado con un contador de centelleo (Scintillation Counter, Beckman LS 6500). Los tejidos de la planta fueron secados a 65°C durante 72 hs y quemados en un oxidador biológico (Packard Tri Carb 307), el $^{14}\text{CO}_2$ resultante fue capturado en 18 ml de una solución de Carbo-Sorb E y Permafluor (1:1 v/v) (Perkin-Elmer, Packard Bioscience BV), luego la radiactividad resultante fue medida igual que la solución de lavado.

La absorción fue expresada como la fracción entre el herbicida detectado en los tejidos oxidados y la radiación medida en la solución de lavado más la radiación en los tejidos oxidados. Los datos fueron analizados según lo sugerido por Kniss *et al.* (2011) mediante un ajuste a una función hiperbólica cuadrática mostrada en la fórmula 2.1 utilizando el programa estadístico “R” con “drc plug-in” (Ritz & Streibig, 2005; R Development Core Team, 2010). Los parámetros “Amax” y “t₉₀” se compararon entre especies.

$$\text{Absorción} = (A_{\text{max}} * t) / (0.11 * t_{90} + t)$$

Fórmula 2.1: El parámetro *Amax* representa la asíntota donde se produce la máxima absorción, *t* es el tiempo luego de la aplicación y *t90* es el tiempo que tarda en alcanzar el 90% de *Amax*.

La translocación se expresa como la fracción entre el [^{14}C] herbicida detectado en la raíz mas el resto de planta y la sumatoria del [^{14}C] herbicida detectado en el total de los tejidos. Los resultados fueron ajustados a un modelo Gompertz dado por la fórmula 2.2 Utilizando el mismo programa estadístico descrito anteriormente. Se comparó el parámetro *Tmax* entre las distintas especies.

$$\text{Translocación} = T_{\max} * e^{-\exp[-(t-k)/b]}$$

Fórmula 2.2: El parametro T_{\max} representa la asíntota de máxima translocación, t es el tiempo luego de la aplicación k es el punto de inflexión y b es la pendiente en el punto de inflexión.

Phosphor Imaging

Mediante un ciclón (phosphor imager Cyclone, Perkin-Elmer, Packard Bioscience BV), pudo visualizarse la translocación del herbicida en las especies estudiadas. Los individuos fueron tratados de la misma forma que para los ensayos de absorción y translocación antes descritos. A las 24, 48, 72 y 96 se extrajeron plantas que fueron lavadas, prensadas, y secadas a 65°C durante 72 hs, luego fueron montadas cuidadosamente en film fosfosensible y escaneadas durante 4 h para observar su dispersión radiactiva.

Resultados

Retención foliar del glifosato

La retención foliar del herbicida muestra diferencias significativas entre las especies, siendo *Parietaria debilis* y *Petunia axillaris* las que menor cantidad de herbicida retienen en relación con su biomasa (Tabla 2.1). Las dos especies restantes muestran valores mayores indicando una cantidad mayor de herbicida retenido y disponible para su ingreso.

Tabla 2.1: Retención foliar en hojas asperjadas con glifosato para *Amaranthus hybridus*, *Parietaria debilis*, *Petunia axillaris* y *Verbena litoralis*. Los valores están expresados en ml de herbicida por g de peso seco. Medias seguidas por letras distintas difieren significativamente según test de Tukey ($\alpha=0,05$).

Especie	Media	Desviación estándar
<i>Amaranthus hybridus</i>	0,7031 b	0,1727
<i>Petunia axillaris</i>	0,5010 a	0,0349
<i>Parietaria debilis</i>	0,4832 a	0,0389
<i>Verbena litoralis</i>	0,6508 b	0,1329

Absorción y translocación de [¹⁴C]glifosato

Tanto el modelo hiperbólico cuadrático como el Gompertz a los que se ajustaron los datos de absorción y translocación respectivamente mostraron una gran correlación con los datos medidos (Tablas 2.2 y 2.3).

La absorción foliar muestra diferencias entre las especies en cuanto a la cantidad máxima de herbicida absorbido (Amax). En *Parietaria debilis* ingresa aproximadamente un 46% menos que en las dos especies restantes, a su vez *Petunia axillaris* y *Amaranthus hybridus* absorben 92 y 93 % del glifosato aplicado respectivamente (Figura 2.1).

Tabla 2.2: Parámetros de la ecuación que representa la regresión hiperbólica cuadrática de la absorción de [¹⁴C] glifosato en *Amaranthus hybridus*, *Parietaria debilis* y *Petunia axillaris*. Los parámetros Amax y t90 representan el valor máximo de absorción estimado y el tiempo necesario para alcanzar el 90% de la absorción máxima respectivamente, el valor de p es el nivel de probabilidad de significancia de cada factor para el modelo.

Parámetro	Estimado	Error standard	Probabilidad (valor de p)
Amax: <i>Amaranthus hybridus</i>	92,91	1,643	<0,0001
Amax: <i>Parietaria debilis</i>	52,92	2,006	<0,0001
Amax: <i>Petunia axillaris</i>	90,23	3,687	<0,0001
t90: <i>Amaranthus hybridus</i>	23,69	4,049	<0,0001
t90: <i>Parietaria debilis</i>	28,12	7,121	0,0004
t90: <i>Petunia axillaris</i>	65,30	8,454	<0,0001
Amax (<i>Amaranthus hybridus</i> / <i>Parietaria debilis</i>)	1,75	0,073	<0,0001
Amax (<i>Amaranthus hybridus</i> / <i>Petunia axillaris</i>)	1,02	0,045	0,5205
Amax (<i>Parietaria debilis</i> / <i>Petunia axillaris</i>)	0,58	0,032	<0,0001

Considerando además el tiempo en el cual ingresa el herbicida *Parietaria debilis* y *Amaranthus hybridus* muestran un patrón temporal similar alcanzando un 90% de la máxima absorción a las 28 y 23 horas respectivamente, no habiendo diferencia significativas entre estos valores, mientras que *Petunia axillaris* presenta un patrón distinto logrando el 90% de la máxima absorción 65 horas luego de la aplicación.

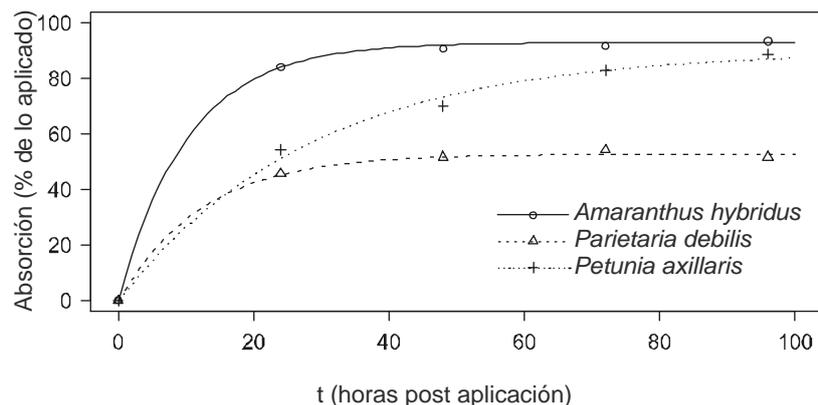


Figura 2.1: Absorción de glifosato en *Amaranthus hybridus*, *Parietaria debilis* y *Petunia axillaris*, datos ajustados al modelo hiperbólico cuadrático propuesto por Kniss *et al.*(2011) .

La translocación de glifosato también muestra diferencias entre las especies estudiadas, a las 24 horas post aplicación el 80% del herbicida aplicado permanecía en la hoja tratada de *Amaranthus hybridus* mientras que en *Parietaria debilis* y *Petunia axillaris* permanecía el 47 y 55 % respectivamente. Con el transcurrir del tiempo los valores se revierten para *Petunia axillaris* mostrando una translocación mayor que la de la especie sensible.

Tabla 2.3: Parámetros estimados de la ecuación gompertz a los que se ajustan los datos de translocación de $[^{14}C]$ glifosato en *Amaranthus hybridus* , *Parietaria debilis* y *Petunia axillaris*. Los parámetros c y e no tienen interpretación directa y Tmax representa el valor máximo de translocación, el valor de p es el nivel de probabilidad de significancia de cada factor para el modelo.

Parámetro	Media	Error standard	p-value
c: <i>Amaranthus hybridus</i>	-0,0357	0,0068	0,0000
c: <i>Parietaria debilis</i>	-0,0797	0,0523	0,1375
c: <i>Petunia axillaris</i>	-0,0594	0,0126	0,0000
Tmax: <i>Amaranthus hybridus</i>	64,4924	3,7306	0,0000
Tmax: <i>Parietaria debilis</i>	21,0765	3,5433	0,0000
Tmax: <i>Petunia axillaris</i>	82,5380	4,9046	0,0000
e: <i>Amaranthus hybridus</i>	31,4740	4,1767	0,0000
e: <i>Parietaria debilis</i>	32,5305	7,8059	0,0002
e: <i>Petunia axillaris</i>	40,4115	2,6609	0,0000
Tmax (<i>Amaranthus hybridus</i> / <i>Parietaria debilis</i>)	3,0599	0,5440	0,0006
Tmax (<i>Amaranthus hybridus</i> / <i>Petunia axillaris</i>)	0,7814	0,0647	0,0019
Tmax (<i>Parietaria debilis</i> / <i>Petunia axillaris</i>)	0,2554	0,0455	0,0000

Podemos estimar que la máxima translocación fue alcanzada por *Petunia axillaris* (82%), mientras que *Parietaria debilis* transloca solo el 21 % del herbicida que ingresa a la planta, estos valores máximos fueron alcanzados 72 horas post aplicación,

finalmente la especie sensible transloca un 64% de lo absorbido teniendo esta última la pendiente menor indicando que la translocación continua a una tasa más estable hasta las 96 hs post aplicación (Fig. 2.2).

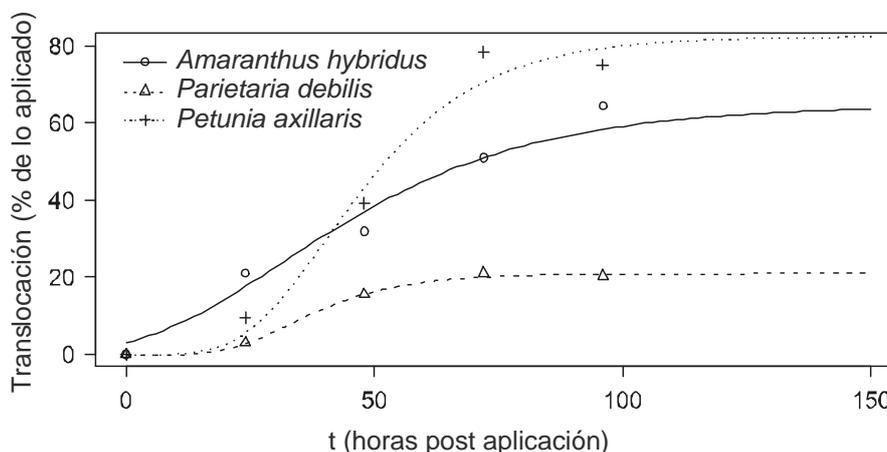


Figura 2.2. Translocación de glifosato en *Amaranthus hybridus*, *Parietaria debilis* y *Petunia axillaris*, datos ajustados al modelo Gompertz.

Phosphorimaging

Las diferencias en la translocación entre las tres especies fueron confirmadas mediante phosphorimaging (Figura 2.3). Se puede apreciar claramente que *Parietaria debilis* no transloca herbicida fuera de la hoja tratada mientras que en *Amaranthus hybridus* y en *Petunia axillaris* el herbicida se mueve hacia otras hojas y hacia la raíz. Es para destacar que a pesar de que la translocación es mayor en *Petunia axillaris* respecto a *Amaranthus hybridus*, se observa que en la primera especie el herbicida radiomarcado se distribuye en todas las hojas y en la segunda solo se mueve hacia las hojas más jóvenes (Figura 2.3).

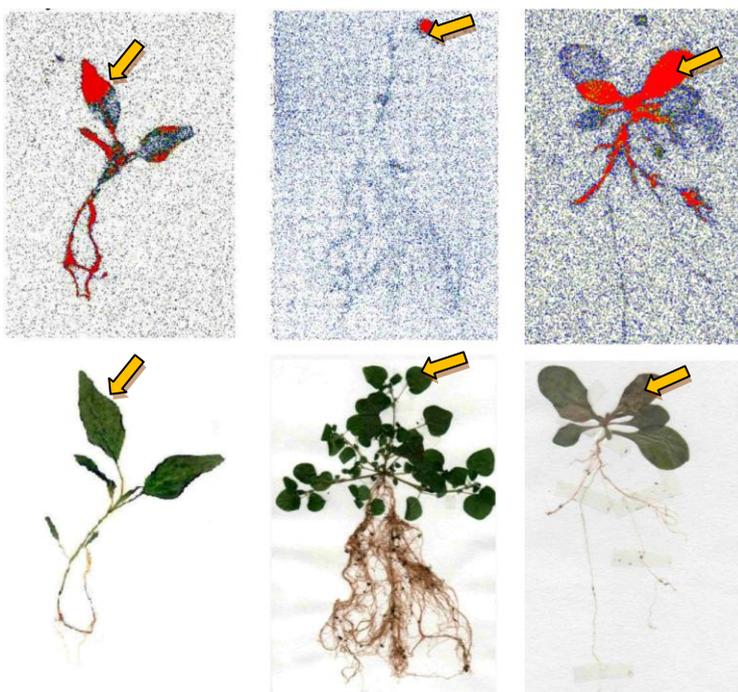


Figura 2.3. Observación de $[^{14}\text{C}]$ glifosato mediante Ciclon (Phosphorimaging) en *Amaranthus hybridus* (izquierda), *Parietaria debilis* (centro) y *Petunia axillaris* (derecha), 72 horas post aplicación, las flechas señalan el punto de aplicación del herbicida marcado.

Discusión

La cantidad de solución herbicida asperjada que es retenida por la superficie foliar determina la cantidad de herbicida que puede ingresar a la planta, por lo que una alteración en la retención foliar del herbicida se constituye en un potencial mecanismo de tolerancia para las malezas. Cambios en la morfología o la composición de la cutícula pueden alterar la intercepción del asperjado o hacer rebotar las gotas, teniendo como consecuencia una disminución de la retención del herbicida (Feng *et al.*, 2004). Una menor retención ha sido correlacionada con una menor susceptibilidad a glifosato en el género *Coniza* (González-Torralva *et al.*, 2010). Los valores de retención foliar para *Parietaria debilis* y *Petunia axillaris* están en el mismo rango que las especies de conizas menos susceptibles. Pero en comparación, los valores de retención de especies difíciles de mojar como trigo o arveja (De Ruiter *et al.*, 1990) son mucho menores a los

obtenidos en este estudio. Por tanto la retención foliar no constituye el parámetro principal que determina la baja susceptibilidad a glifosato en las especies estudiadas.

Los valores de absorción para *Parietaria debilis* son equivalentes a otros citados para otras especies tolerantes o resistentes (Tabla 2.4). Se han encontrado referencias previas que indican que *Amaranthus hybridus* absorbe entre 93,5 y 95,0% del [¹⁴C]glifosato aplicado (Tabla 2.4), los resultados obtenidos en este trabajo concuerdan con esto. Para *Petunia axillaris* los valores de absorción son parecidos a los de una especie sensible (Tabla 2.4), por lo cual su tolerancia no estaría relacionada con este proceso.

Tabla 2.4: Listado de trabajos relacionados con estudios de absorción y translocación de glifosato en especies resistentes o tolerantes comparados con especies o biotipos sensibles. Referencias: S: especies o biotipos sensibles; R: biotipo resistente o especie tolerante.

Especie	Absorción (S/R)	Translocación (S/R)	Referencia
<i>Canavalis ensiformis</i>	93/63	60/32	Cruz-Hipolito <i>et al.</i> , 2009
<i>Conyza bonariensis</i>	-	35/13-18	Dinelli <i>et al.</i> , 2008
<i>Conyza bonariensis</i>	-	30/20	Koger & Reddy, 2005
<i>Lolium multiflorum</i>	-	49/26	Perez-Jones <i>et al.</i> , 2007
<i>Lolium perenne</i>	-	64/53	Wakelin <i>et al.</i> , 2004
<i>Mucuna pruriens</i> var. <i>utilis</i>	94/50	58/30	Rojano-Delgado <i>et al.</i> , 2012
<i>Clitoria ternatea</i>	95/70	58/29	Cruz-Hipolito <i>et al.</i> , 2011
<i>Neonotonia wightii</i>	95/80	58/29	Cruz-Hipolito <i>et al.</i> , 2011
<i>Senna obtusifolia</i>	68	-/-	Walker & Oliver, 2008
<i>Conyza canadensis</i>	42-46/42-58	-/-	Feng <i>et al.</i> , 2004
<i>Brachiaria ramosa</i>	40	- /11	Burke <i>et al.</i> , 2007
<i>Amaranthus palmerii</i>	62	- /15	(Burke <i>et al.</i> , 2007)
<i>Ipomoea grandiflora</i>	93/80	- /11	(Monquero <i>et al.</i> , 2004b)
<i>Commelina benghalensis</i>	93/66	- /26	(Monquero <i>et al.</i> , 2004b)
<i>Conyza sumatrensis</i>	52	- /17	(González-Torralva <i>et al.</i> , 2010)
<i>Conyza bonariensis</i>	49	- /15	(González-Torralva <i>et al.</i> , 2010)
<i>Conyza canadensis</i>	37	- /7	(González-Torralva <i>et al.</i> , 2010)

En condiciones controladas, la absorción de glifosato parece no continuar después de tres días de realizada su aplicación sobre plantas de *Convolvulus arvensis* L., *Convolvulus sepium* L. y *Cirsium arvense* (L.) Scop. Sin embargo, *Ipomoea purpurea* (L.) Roth y *Polygonum convolvulus* L. mostraron absorción adicional y movimiento fuera de la hoja tratada después de los tres días (Sandberg *et al.*, 1980). Según los

resultados mostrados en este trabajo, *Amaranthus hybridus*, *Parietaria debilis* y *Petunia axillaris* responderían como el primer grupo absorbiendo el 90% del herbicida aplicado a las 23, 28 y 65 horas respectivamente, aunque para *Petunia axillaris* el patrón de absorción podría determinar que absorva aún luego del tercer día.

Muchas especies de malezas presentan actualmente resistencia al glifosato, el principal mecanismo responsable de esta resistencia es aparentemente una translocación limitada hacia los meristemas (Shaner, 2009). En especies tolerantes también se describe a este proceso como uno de los principales factores que determinan la baja susceptibilidad al herbicida (Cruz-Hipolito *et al.*, 2009, 2011; Rojano-Delgado *et al.*, 2012). Los valores de translocación encontrados en otros biotipos resistentes están entre 16 y 53 % mientras que en especies susceptibles se encuentran entre 30 y 64% (Tabla 2.4). Los valores de translocación en *Parietaria debilis* se encuentran por debajo de los encontrados para todas las especies susceptibles y entre los valores más bajos de las especies resistentes o tolerantes citadas. Por otra parte, en *Petunia axillaris* a pesar de tener una translocación similar a la especie sensible, posee un patrón distinto de acumulación, en la figura 2.3 se visualiza que el herbicida radiomarcado está acumulado en las hojas más jóvenes, no apreciándose acumulación en las hojas más viejas. Este patrón había sido observado también en plantas de *Lolium rigidum* Gaudin en las cuales biotipos sensibles y resistentes poseían una fracción similar de herbicida translocado, pero mientras el biotipo sensible de esta especie tuvo mayor acumulación en las bases de las hojas y raíces, el biotipo resistente acumuló mayor cantidad de herbicida en la zona apical de las láminas foliares (Lorraine-Colwill *et al.*, 2002). El glifosato actúa sobre la EPSPs la cual registra los mayores niveles de expresión en los tejidos meristemáticos y tejidos jóvenes, particularmente estos tejidos son los más sensibles al glifosato, requiriendo menor concentración de herbicida para senescer (Shaner, 2009).

Conclusión

La retención foliar de glifosato es menor en las especies tolerantes, sin embargo analizando la literatura existente sobre este tema, en estas especies no puede atribuirse a este factor un rol clave en la menor susceptibilidad al glifosato. La absorción y translocación, por otra parte, difieren significativamente entre especies tanto en sus valores máximos como en los tiempos en alcanzar estos valores. Sin embargo, solo en *Parietaria debilis* se puede correlacionar su menor susceptibilidad con una reducida absorción y limitada translocación del herbicida, mientras que en *Petunia axillaris* la menor sensibilidad al glifosato podría estar relacionada con un mayor tiempo de ingreso y movimiento del herbicida, una distribución preferencial del glifosato hacia los meristemas o bien, algún otro mecanismo no contemplado en estos ensayos.

Los valores de *A. hybridus* por otra parte se encuentran dentro de los rangos esperados para esta especie.

Capítulo 3:

Superficie foliar y daño anatómico

Resumen

La eficacia biológica de la aplicación de herbicidas, particularmente del glifosato es afectada por las características foliares que permiten una adecuada retención y absorción del mismo. Además de esto las características anatómicas y el daño producido a este nivel podrían ayudar a comprender el movimiento o la acción del glifosato en las especies *Amaranthus hybridus*, *Parietaria debilis* y *Petunia axillaris*.

En este capítulo se comparan la densidad de tricomas y estomas, la cantidad y composición de las ceras epicuticulares en las tres especies mencionadas, con el objetivo de analizar si estas características contribuyen a una menor susceptibilidad al glifosato, y se analizan las alteraciones producidas en la anatomía de estas especies luego de la aplicación de glifosato.

Petunia axillaris y *Parietaria debilis* poseen una superficie foliar con una alta densidad de tricomas. Con respecto a la cantidad de cantidad de ceras, la primer especie muestra los valores significativamente más altos con una composición química que resultó similar a la de la especie sensible. *Parietaria debilis*, por otro lado aunque mostró una cantidad de ceras epicuticulares no significativamente distinta a la de la especie sensible, si difiere en la composición de las mismas, encontrándose mayor proporción de grupos químicos de carácter hidrofóbico.

Con respecto a las variaciones anatómicas post aplicación de glifosato tanto en *Amaranthus hybridus* como en *Parietaria debilis* se observó una reducción del espesor de la lamina foliar, causado en la primer especie por la reducción del espesor de la epidermis adaxial y el parénquima radiado y en la segunda por la pérdida de especies intercelulares del parénquima lagunoso.

Introducción

La eficacia del glifosato depende, en primer lugar, de la penetración y absorción por vía foliar del ingrediente activo y finalmente de su translocación hasta el resto de la planta. Las tasas de absorción foliar y, consecuentemente, la eficacia biológica de la aplicación de herbicidas es afectada en gran medida por la morfología y composición química de la superficie foliar y por la permeabilidad de la cutícula de los cultivos y de las malezas (Baker, 1982). Debido a su comportamiento hidrofílico, la primera barrera foliar que debe vencer este herbicida para su absorción es la cutícula, conformada por

ceras cuticulares y epicuticulares de naturaleza hidrofóbica. Éstas y otras características de la superficie foliar como la rugosidad o presencia de tricomas y estomas, además de su anatomía foliar pueden afectar la eficacia de absorción del glifosato en las malezas, interviniendo en la adherencia y penetración del herbicida (Huangfu *et al.*, 2009)

En primer lugar, la densidad de estomas, tricomas y glándulas presentes en la epidermis foliar producen variaciones en la morfología de la superficie foliar que se relacionan con la absorción diferencial de herbicidas (Monquero *et al.*, 2004a), lo cual afecta el mojado y la penetración de los herbicidas que deben ingresar al vegetal por vía foliar (Mcwhorter & Ouzts, 1994). Estos componentes de la epidermis varían en forma y cantidad en función de la especie (Esau, 1987) y dentro de la misma especie pueden variar en función de las condiciones de crecimiento de cada individuo en particular (Hatterman-Valenti *et al.*, 2011).

Los tricomas presentes en la superficie foliar pueden interceptar las gotas de una aspersión impidiendo que estas alcancen la epidermis propiamente dicha (Ricotta & Masiunas, 1992) y en general, existe una correlación positiva entre su densidad y la absorción del herbicida (Huangfu *et al.*, 2009).

La absorción foliar puede estar correlacionada también con el número de estomas, sin embargo generalmente solo el 10 % de los estomas contribuyen a la absorción, como fue estudiado en *Allium porrum* L. (cv. Tropita) (Eichert & Burkhardt, 2001). En esta especie la penetración a través de los estomas está controlada por la distribución de las ceras epicuticulares (Eichert & Burkhardt, 2001), de esta forma la cantidad y presencia de ceras sobre los estomas afectará la absorción por esta vía.

Sin embargo, entre todas las características foliares la cutícula ha sido considerada como la principal barrera que actúa sobre la absorción foliar de herbicidas (Bukovac, 1976). La cutícula es una capa lipídica extracelular, un biopoliéster insoluble

en agua de elevado grado de entrecruzamiento entre los ácidos grasos hidroxilados de cadena larga y posee un espesor que oscila entre 0,5 y 15 μm . Está formada de adentro hacia fuera por: a) una capa de sustancias pécticas; b) una región que contiene cutina y además puede contener celulosa; c) una zona más externa (cutícula propiamente dicha) que contiene cutina y ceras (ceras intracuticulares) y carece de compuestos típicos de la pared celular; y d) sobre la cutícula propiamente dicha una capa de ceras epicuticulares (Baker, 1982).

Las ceras se destacan como la principal barrera a las pérdidas por transpiración y a la entrada de productos químicos hidrosolubles (Santier & Chamel, 1998). A pesar que la morfología de las mismas es controlada genéticamente, la cantidad y distribución pueden ser modificadas por las condiciones ambientales (Barthlott *et al.*, 1998) como temperatura, humedad, intensidad de luz, fotoperíodo y pH; aunque la temperatura es el factor más importante (Hull *et al.*, 1975; Riederer & Schreiber, 2001). En varias especies se encontró que la mayor tolerancia a los herbicidas era consecuencia de una mayor cantidad de ceras superficiales, las que bloqueaban la absorción. En *Commelina benghalensis* L. se estableció que el principal mecanismo de tolerancia al glifosato fue la absorción diferencial relacionada con características de las ceras epicuticulares y la presencia de un metabolismo diferencial (Monquero *et al.*, 2004a). La remoción de estas ceras con cloroformo incrementó la absorción de glifosato en plantas de coca (*Erythroxylum coca* var. *coca* (Lam.)) comparada con individuos con las ceras epicuticulares intactas (Ferreira & Reddy, 2000).

Las ceras se depositan sobre la cutícula formando cristales (Baker, 1982; Hess *et al.*, 1974). Estas ceras epicuticulares contienen principalmente una variedad de hidrocarburos de cadenas cortas y largas, alcoholes, ácidos, ésteres, aldehídos y triterpenos (Baker, 1982). La cera es considerada esencialmente no polar lo que le

confiere características hidrofóbicas, sin embargo existen variaciones entre especies. Dentro de los compuestos constituyentes de las ceras, los hidrocarburos son considerados altamente hidrofóbicos mientras que los alcoholes, ésteres y ácidos son relativamente hidrofílicos (Baker, 1982), además compuestos de cadenas carbonadas más largas resultan más hidrofóbicos que sus homólogos de cadenas más cortas (Wen *et al.*, 2006). La proporción relativa de los compuestos que forman las ceras epicuticulares pueden ofrecer una idea de cuál es el grado de hidrofobia de la superficie foliar de cada planta en particular. La composición de las ceras tendría una relación más directa con la absorción que la cantidad total (Monquero *et al.*, 2004a).

Finalmente también la morfología de las plantas, principalmente de las hojas, tiene influencia sobre la cantidad de herbicida interceptado y retenido; la anatomía de las hojas prácticamente determina la facilidad con la que estos productos serán absorbidos, por lo que el estudio anatómico de las hojas puede mejorar la comprensión de las barreras que cada especie impone a la absorción de los herbicidas y, consecuentemente, proporcionar estrategias para superar estos obstáculos. Por lo tanto, el análisis anatómico foliar podría ser aplicado con éxito en la identificación de las especies sensibles, tolerantes o resistentes a ciertos químicos, así como en la descripción de los síntomas fitotóxicos, contribuyendo a los estudios de selectividad del herbicida a las especies terrestres o acuáticas (Procópio *et al.*, 2003b). El glifosato genera post aplicación una serie de cambios anatómicos. En *Brachiaria subquadripata* (Trin.) Hitchc. aumentó el porcentaje de haces vasculares y de lagunas en el aerénquima a los 16 días post aplicación (Costa *et al.*, 2011). Tuffi Santos *et al.* (2004) mencionan que el glifosato produce sobre la anatomía foliar una desorganización completa del mesófilo que termina con la muerte celular, no afecta a los tejidos epidérmicos ni a los vasculares; sin embargo, en otras especies tolerantes se observó la desaparición o

decoloración de los plastidios y un colapso del parénquima en empalizada sin producción de muerte celular (Traggiay *et al.*, 2009).

El análisis de la influencia de la superficie y anatomía foliar en la deposición y subsecuente absorción y translocación del herbicida podrá ayudar a comprender mejor el comportamiento de una especie de maleza a un determinado herbicida. El objetivo de este capítulo es analizar en *Petunia axillaris*, *Parietaria debilis* y *Amaranthus hybridus* las características de la superficie y anatomía foliar que podrían contribuir a una menor susceptibilidad al glifosato, y analizar las alteraciones producidas en la anatomía de estas especies luego de la aplicación de glifosato.

Metodología

Material vegetal

Se cultivaron plantas de *Parietaria debilis*, *Petunia axillaris* y *Amaranthus hybridus*. Las semillas de todos los individuos fueron colectadas de poblaciones de campos cultivados en la ciudad de Esperanza (31° 26'S and 60° 56'W). Todas las semillas germinaron en papel de filtro húmedo dentro de placas de Petri, luego fueron trasplantadas a macetas que contenían una mezcla de turba y tierra (1:2 v/v) en sala de crecimiento a una temperatura de 28/18°C (día y noche) con un fotoperíodo de 16 h y una intensidad lumínica de 500 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ con 60 – 80 % de humedad relativa.

Caracterización de la superficie foliar

Se contabilizaron los estomas y los tricomas en la región central de la superficie adaxial de la lámina foliar. Para esto se desprendió la epidermis adaxial en la región media de la lamina foliar correspondiente a la zona inmediata adyacente a la nervadura central. La selección de esta zona de la hoja se fundamenta en que la frecuencia estomática generalmente es mayor en el ápice y en la base foliar, así como también es

mayor en los bordes de la lámina comparada con la región vecina a la nervadura central (Knecht and Orton, 1970). Las muestras de epidermis fueron montadas en sendos portaobjetos con agua y se fotografiaron a 400 aumentos con una cámara Canon Rebel T3i 600d montada a un microscopio Leica DM1000 y controlada desde ordenador. Las imágenes fueron calibradas mediante fotografías a la misma resolución de una escala graduada, y analizadas mediante el programa ImageJ (Abramoff *et al.*, 2004). Sobre estas imágenes se contó el número de estomas y número de tricomas sobre una superficie conocida y se expresaron como densidad estomática (estomas/mm²) y densidad de tricomas (tricomas/mm²).

Las mediciones se realizaron en 15 preparados por especie extraídos de 5 plantas (3 preparados por planta). Se analizó estadísticamente cada factor (densidad estomática y densidad de tricomas) mediante el test LSD a nivel de 0,05 para evaluar si había diferencias significativas debidas a la especie.

Caracterización de cantidad y calidad de ceras epicuticulares

Las ceras epicuticulares se extrajeron de 40 hojas de 10 plantas por especie. Las hojas de cada especie fueron introducidas separadamente en recipientes con cloroformo y metanol (90:10 ml) por 30 segundos agitándose suavemente para evitar que las hojas se rompan y se produzca la liberación de clorofila y otros compuestos. Los extractos obtenidos fueron filtrados y evaporados sobre una placa a 55 °C hasta reducir el volumen a aproximadamente 15 ml. Esta solución (cloroformo+ceras) fue transferida a tubos de 25 ml de peso conocido. El cloroformo fue evaporado a temperatura ambiente y los tubos se pesaron a los 2 y 4 días (hasta alcanzar peso constante) después de la obtención del residuo sólido (ceras). La cantidad de ceras se expresó por unidad de área foliar (µg/cm²). Para esto se determinó el área foliar de todas las hojas utilizadas previo a la extracción con un medidor de área foliar LI-COR modelo 3000. Se analizó

estadísticamente para evaluar diferencias significativas debido a la especie mediante el test LSD a nivel de 0,05.

Para los análisis químicos de las ceras se siguió la metodología propuesta por Chachalis *et al.*(2001). Los residuos sólidos obtenidos del ensayo anterior fueron disueltos en 500 μ L de cloroformo. Cada muestra fue inyectada en un cromatógrafo gaseoso con un detector de masa equipado con un autodetector. Se utilizó una columna capilar de silicio (12m x0,2 mm de diámetro interno) recubierta con una película de 0,33 mm de metilsilicona, directamente sobre la fuente de ionización. La fuente de iones se mantuvo a una presión de 1025 Torr, y se utilizó Helio ultra puro como gas carrier. La temperatura de trabajo se fijó según se detalla: ion source, 200 °C; injection port, 300 °C; transfer lines, 300 °C. La temperatura fue elevada de 40 a 125°C a una tasa de 70°C por minuto y de 125 a 300°C a una tasa de 4°C por minuto. Un microlitro de la mezcla que contenía las ceras fue inyectado en el puerto correspondiente. El espectro fue medido entre 400 y 700 daltons; el porcentaje por el cual cada componente de la cera contribuye al total fue medido integrando el área bajo los picos (Kitson *et al.* 1996).

Utilizando base de datos de LIPID Metabolites And Pathways Strategy (LIPID MAPS) (Fahy *et al.*, 2008) se determinaron los compuestos principales y se clasificaron según los grupos químicos correspondientes. Se analizaron diferencias debido a la especie en cuanto a la proporción de los diferentes grupos químicos (ácidos grasos, alcoholes o esterés) mediante el test LSD a nivel de 0,05.

Estudios anatómicos foliares

Para evaluar el daño anatómico foliar causado por el herbicida se aplicó sobre individuos de las tres especies una dosis de 100 g ia ha⁻¹ de glifosato. El glifosato utilizado estaba formulado como Roundup® Power (sal isopropanilamina 48% p/v).

Todas las aplicaciones se realizaron con una cámara de asperjado de laboratorio equipada con pastillas de abanico plano teejet 8001, calibradas para asperjar 200 L ha⁻¹ a una presión de 275 kPa.

Posteriormente, se extrajeron muestras de la región central de la penúltima hoja expandida al momento de la aplicación de cada especie a las 0, 12, 24, 48, 72 y 96 horas post tratamiento, las mismas fueron fijadas en FAA a continuación se deshidrataron en una serie creciente de alcoholes y luego fueron incluidas en parafina-cera para la obtención de los preparados histológicos permanentes. Se efectuaron cortes transversales normalizados de la hemilámina con micrótopo rotativo, los que fueron coloreados con safranina-fast green. Se digitalizaron imágenes a partir de los preparados los cuales fueron fotografiados con una cámara Canon Rebel T3i 600d montada a un microscopio Leica DM1000 y controlada desde ordenador. Las imágenes fueron calibradas mediante fotografías a la misma resolución de una escala graduada y analizadas mediante el programa ImageJ; las que fueron utilizadas para la descripción anatómica de cada especie. Además se cuantificaron los espesores de los tejidos encontrados y se determinó si existían diferencias significativas mediante el test de LSD debidas a la aplicación del herbicida por especie y por tiempo.

Resultados

Caracterización de la superficie foliar

Los estomas en todas las especies son del tipo anomocíticos, es decir sin células anexas, se encuentran al mismo nivel que las células epidérmicas propiamente dichas y presentan una distribución dispersa característica de especies dicotiledóneas (Fig. 3.1). La frecuencia estomática varía entre 197 y 402 estomas por mm² (Tabla 3.1). *Parietaria debilis* tiene la mayor frecuencia estomática mientras que *Petunia axillaris* presenta aproximadamente la mitad del número de estomas que la especie anterior.

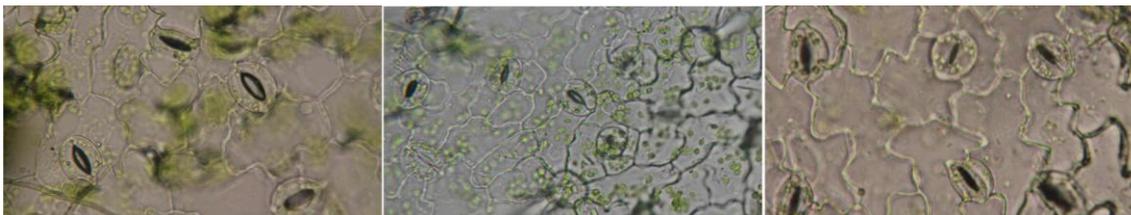


Figura 3.1: Superficie foliar de *Petunia axillaris* (izquierda), *Parietaria debilis* (centro) y *Amaranthus hybridus* (derecha). El ancho de cada imagen es de 298 μm .

A. hybridus no presenta tricomas en su epidermis adaxial, mientras que las dos especies restantes presentan una densidad de tricomas similar (Tabla 3.1). *Parietaria debilis* posee tricomas en forma de pelos simples unicelulares de $70.25 \pm 12.09 \mu\text{m}$ de largo, mientras que *Petunia axillaris* cuenta con pelos simples pluricelulares glandulares con una longitud media de $124.8 \pm 15.17 \mu\text{m}$.

Tabla 3.1: Parámetros epidérmicos de *Petunia axillaris*, *Parietaria debilis* y *Amaranthus hybridus*. Los estomas y tricomas fueron contabilizados de la epidermis foliar adaxial de cada especie mientras que las ceras fueron extraídas de ambos lados de los folíolos de cada especie respectivamente. Letras distintas indican diferencias significativas debido a la especie según test de LSD $\alpha=0,05$.

Especie	Estomas /mm ²	Error estandard	Tricomas /mm ²	Error estandard	Ceras $\mu\text{g}/\text{cm}^2$	Error estandard
<i>Amaranthus hybridus</i>	306,8 b	25,84	0,0 a	0,00	41,32 a	8,60
<i>Parietaria debilis</i>	402,5 c	32,44	134,6 b	34,74	42,71 a	2,39
<i>Petunia axillaris</i>	197,6 a	28,63	119,2 b	21,82	92,01 b	3,29

Por otra parte, la cantidad de ceras epicuticulares solo mostró diferencias significativas para *Petunia axillaris*, mientras que las medias de las dos especies restantes resultaron similares (Tabla 3.1).

En cuanto a la composición de las ceras epicuticulares se encontraron 76 compuestos a partir de los fragmentos detectados por cromatografía, de los cuales solo 30 eran comunes a las 3 especies. *Parietaria debilis* fue la especie que presentó la composición más compleja, con 62 compuestos detectados, de los cuales 10 representaban el 50 % de la composición en peso de las ceras (Fig. 3.2). Del análisis de la posible identidad de los compuestos registrados por el cromatógrafo, se pudo observar que las tres especies poseen la misma proporción de fosfolípidos, los cuales

abarcan compuestos de entre 23 y 37 carbonos, sin embargo dentro de estos fosfolípidos *Parietaria debilis* posee los que tienen mayor relación masa/carga, y una proporción menor de esteres (Tabla 3.2).

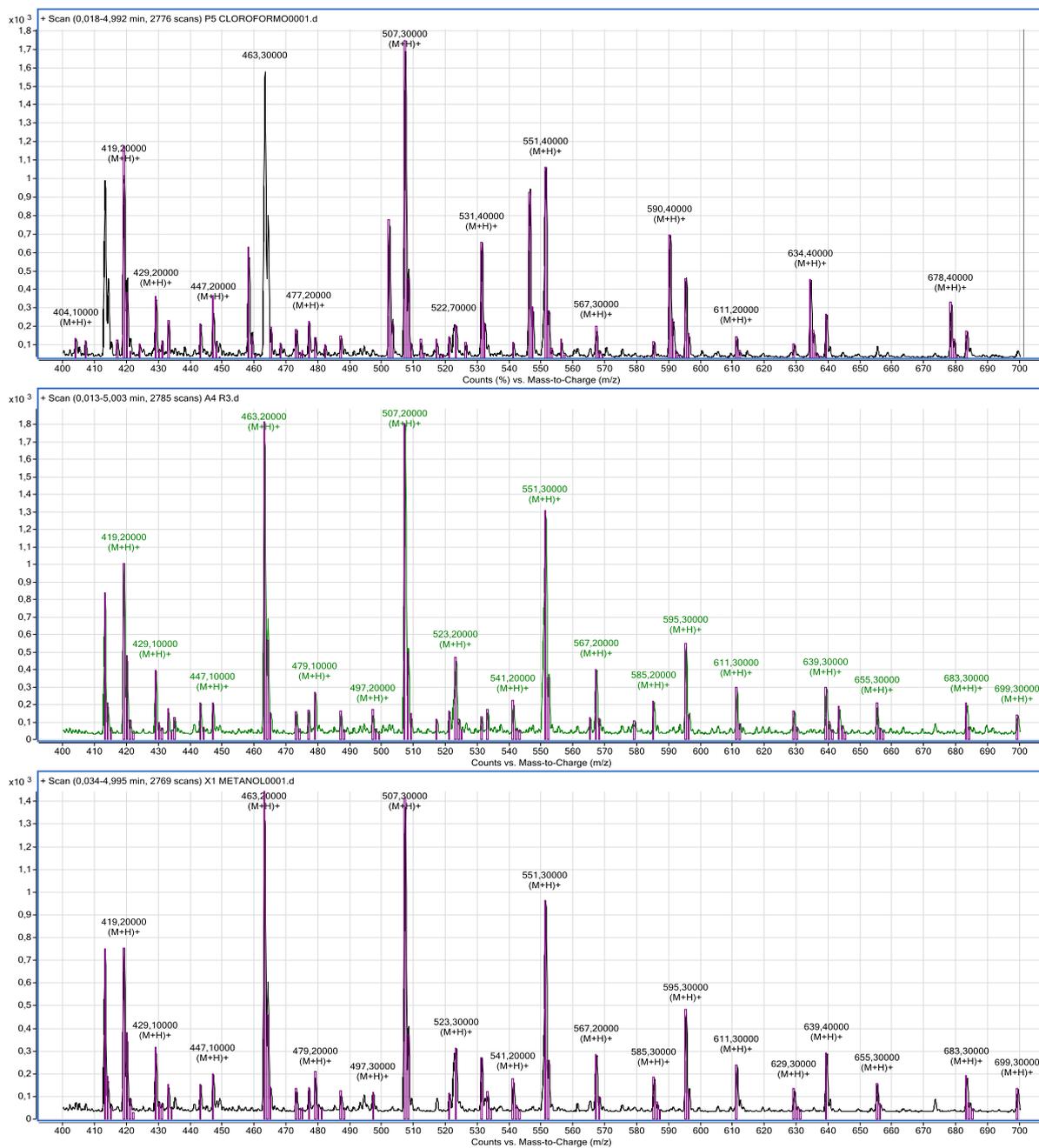


Figura 3.2: Cromatograma correspondiente a la composición de las ceras epicuticulares de *A. hybridus* (arriba), *Parietaria debilis* (centro) y *Petunia axillaris* (abajo).

Tabla 3.2: compuestos detectados en las ceras epicuticulares de *Parietaria debilis*, *A. hybridus* y *Petunia axillaris*, se omiten los componentes que representaban menos del 1 % del total de ceras.

m/z	Fórmula	Grupo	Proporción del compuesto en el peso total			Nomenclatura
			<i>Parietaria debilis</i>	<i>Amaranthus hybridus</i>	<i>Petunia axillaris</i>	
413,3	C ₂₆ H ₃₉ NO ₃	Amidas	4,7	5,3	6,1	N-(4Z,7Z,10Z,12E,16Z,19Z-docosahexaenoyl)- γ -aminobutyric acid
414,2	C ₂₁ H ₃₄ O ₈		2,2	1,2	1,4	methyl 9,11-epidioxy-12,15-dihydroperoxy-5,7,13-eicosatrienoate
419,3	25H ₄₁ NO ₄	Amidas	4,9	6,3	6,1	N-hexadecanoyl-tyrosine
420,4	C ₂₈ H ₅₂ O ₂	Esteres	2,2	2,9	2,9	9Z-tetradecenyl 9Z-tetradecenoate
429,3	C ₂₃ H ₄₃ NO ₆	Esteres		2,5	2,4	hexadecanedioic acid mono-L-carnitine ester
429,2			1,7			
433,1	C ₂₁ H ₂₁ O ₁₀	Flavonoides	1,1		1,2	
447,2			1,3			
458,2	C ₂₃ H ₃₉ O ₇ P	Fosfolípidos	2,8			1-(5Z,8Z,11Z,14Z-eicosatetraenoyl)-sn-glycero-3-phosphate
463,2	C ₂₄ H ₃₁ O ₉	Fosfolípidos	7,5	10,6	10,8	estra-1,3,5(10)-triene-3,16 α ,17 β -triol 17-D-glucuronide
464,5	C ₃₁ H ₆₀ O ₂	Esteres	3,8	4,4	5,0	Pentadecyl 9Z-hexadecenoate
479,2			0,7	1,7	1,5	
502,3	C ₂₂ H ₄₆ O ₈ S ₂	Alcohol	3,6			Docosanediol-1,14-disulfate
503,3			1,2			
507,3	C ₂₃ H ₄₂ NO ₉ P	Fosfolípidos	8,0	11,3	11,2	1-(9Z,12Z-heptadecadienoyl)-glycero-3-phosphoserine
508,3	C ₂₄ H ₄₅ O ₉ P	Fosfolípidos	2,4	3,3	3,3	1-(9Z,12Z-octadecadienoyl)-glycero-3-phospho-(1'-sn-glycerol)
522,7			1,0		2,4	
523,3	C ₂₄ H ₄₆ NO ₉ P	Fosfolípidos	1,0	2,8	2,6	1-(9Z-octadecenoyl)-sn-glycero-3-phosphoserine
531,3	C ₂₇ H ₅₀ NO ₇ P	Fosfolípidos	3,1	0,8	2,2	1-(10Z,13Z,16Z-nonadecatrienoyl)-sn-glycero-3-phosphocholine
541,2			0,5	1,3	1,3	
546,4	C ₃₇ H ₅₄ O ₃	Fosfolípidos	4,5			3-Hexaprenyl-4-hydroxybenzoic acid
547,4			1,4			
551,4	C ₂₇ H ₅₄ NO ₈ P	Fosfolípidos	5,0	8,0	7,8	1-hexadecanoyl-2-propionyl-sn-glycero-3-phosphocholine
552,3			1,4	2,4	2,2	
567,2			0,8	2,5	2,3	
585,3			0,6	1,4	1,5	
590,4	C ₃₁ H ₅₀ O ₈ P	Fosfolípidos	3,3			1-dodecanoyl-2-(9Z-hexadecenoyl)-glycero-3-phosphate
591,3			1,1			
595,2	C ₂₆ H ₄₅ NO ₁₀ S ₂		2,2	3,4	3,8	N-(3 α ,7 α ,12 α -trihydroxy-5 β -cholan-24-oyl)-taurine 3-sulfate
611,2			0,7	1,8	1,9	
634,4			2,2			
639,4			1,3	1,8	2,4	
655,3				1,2	1,3	
678,4			1,5			
683,3			0,8	1,3	1,5	

Anatomía foliar

Los cortes anatómicos de *A. hybridus* presentan un espesor medio de lámina de 154 \pm 11 μ m, las epidermis tanto abaxial como adaxial son simples, sus células son de forma y espesor similar (Tabla 3.3). El mesófilo exhibe una típica anatomía tipo Kranz (típica para especies C4); se observa un parénquima radiado que ocupa la mayor proporción de la superficie de tejido, con un espesor de 111.8 \pm 9.8 μ m. Se pudo

detectar además, la presencia de drusas en el mesófilo siendo éstas más abundantes en las regiones próximas a los haces vasculares.

Tabla 3.3: Parámetros anatómicos foliares de *Parietaria debilis*, *Amaranthus hybridus* y *Petunia axillaris* 0, 12, 24, 48, 72 y 96 horas post aplicación de glifosato.

Especie	hat	Resumen	Espesor					
			Lámina	Epidermis abaxial	Epidermis adaxial	Parénquima empalizada	Parénquima lagunoso	Parénquima radiado
<i>A. hybridus</i>	0	Media	154,3 c	22,2 bc	20,2 bc			111,8a
	0	D.E.	11,12	2,79	2,76			9,82
	12	Media	92,0 a	8,8 a	10,2 a			72,9c
	12	D.E.	4,83	3,06	1,91			4,38
	24	Media	103,1 a	12,7 ab	8,9 a			81,3bc
	24	D.E.	10,92	2,94	2,56			12,79
	48	Media	130,1 b	22,0 bc	12,7 ab			95,3ab
	48	D.E.	6,04	3,33	1,61			5,62
	72	Media	140,4 bc	25,1 c	23,5 c			91,7bc
	72	D.E.	13,51	8,22	6,57			11,22
	96	Media	103,4 a	12,6 ab	14,7 ab			76,0c
	96	D.E.	10,22	4,02	2,38			8,92
<i>P. axillaris</i>	0	Media	283,8 a	19,5 a	29,4 a	98,0 a	136,5 a	
	0	D.E.	6,31	3,03	6,11	3,28	5,37	
	24	Media	271,9 a	23,7 a	28,5 a	99,4 a	122,2 a	
	24	D.E.	7,47	3,27	2,21	3,96	19,28	
	48	Media	271,8 a	18,8 a	30,5 a	101,2 a	137,6 a	
	48	D.E.	7,82	2,39	4,77	8,16	3,89	
	72	Media	265,8 a	22,2 a	22,8 a	103,2 a	115,6 a	
	72	D.E.	21,16	2,14	3,35	3,5	10,33	
	96	Media	267,5 a	22,5 a	27,6 a	110,9 a	111,5 a	
	96	D.E.	9,52	2,71	11,48	3,87	7,8	
<i>P. debilis</i>	0	Media	103,7 c	14,8 a	18,5 a	23,9 a	46,3 b	
	0	D.E.	5,10	2,08	4,66	1,19	3,52	
	12	Media	80,4 a	17,4 a	18,3 a	19,5 a	25,0 a	
	12	D.E.	1,78	3,23	5,62	1,86	6,79	
	24	Media	87,6 ab	16,9 a	23,5 a	23,9 a	23,2 a	
	24	D.E.	6,48	1,35	6,20	2,64	6,04	
	48	Media	96,3 bc	18,5 a	17,0 a	31,6 b	29,1 a	
	48	D.E.	14,56	9,35	6,32	5,87	12,30	
	72	Media	80,2 a	18,2 a	19,0 a	22,5 a	20,3 a	
	72	D.E.	4,33	1,87	3,31	3,67	3,67	
	96	Media	91,0 bc	16,6 a	24,3 a	22,6 a	27,4 a	
	96	D.E.	4,37	4,21	3,18	3,96	6,95	

Referencias: por especie y por parámetro medido letras distintas indican diferencias significativas según el test de Tukey $\alpha=0,05$; DE, desvío estándar; t, horas luego de la aplicación de glifosato

Parietaria debilis posee el menor espesor de lámina foliar entre las especies estudiadas (103 +/-5) del cual el 23 % lo ocupa el clorénquima en empalizada formado

por una hilera de células con forma aovada; el 55 % del espesor de la lámina lo ocupa el parénquima lagunoso, esta porción de parénquima lagunoso es ocupado en su mayor parte por espacios intercelulares (Fig. 3.3). Dentro de células de la epidermis adaxial se encontraron cistolitos globoides (uno por célula) que ocupaban la totalidad del lumen celular, se pudieron contabilizar en los cortes anatómicos hasta 4 cistolitos por cada 1000 μm de tejido.

En *Petunia axillaris* se registró el mayor espesor de lámina foliar ($283\pm 6 \mu\text{m}$), las células epidérmicas abaxiales y adaxiales presentan diferencia de espesor, siendo mayores las que pertenecen a la epidermis adaxial; el mesófilo está compuesto por parénquima en empalizada de dos capas de células alargadas; el parénquima lagunoso ocupa el $52 \pm 3 \%$ del espesor total, presenta células de distinta forma y tamaño con una distribución irregular, aunque a diferencia de *Parietaria debilis* ocupan la mayor proporción del espacio las células parenquimáticas.

En cuanto a las variaciones anatómicas post aplicación del glifosato, *A. hybridus* reduce su espesor total foliar a partir de las 12 horas post aplicación. Estos cambios son significativos cuando se analiza al mismo tiempo la epidermis adaxial y el espesor del parénquima radiado (Tabla 3.3). Esta reducción se produce, posiblemente, por un colapso de las células clorenquimáticas ubicadas por encima de los haces vasculares hacia la parte adaxial de la lámina foliar.

Petunia axillaris no evidenció alteraciones visibles en cuanto a los espesores de los distintos tejidos medidos a los tiempos evaluados (Tabla 3.3), tampoco se observó ninguna anomalía en la anatomía foliar producida por esta aplicación (Fig. 3.3).

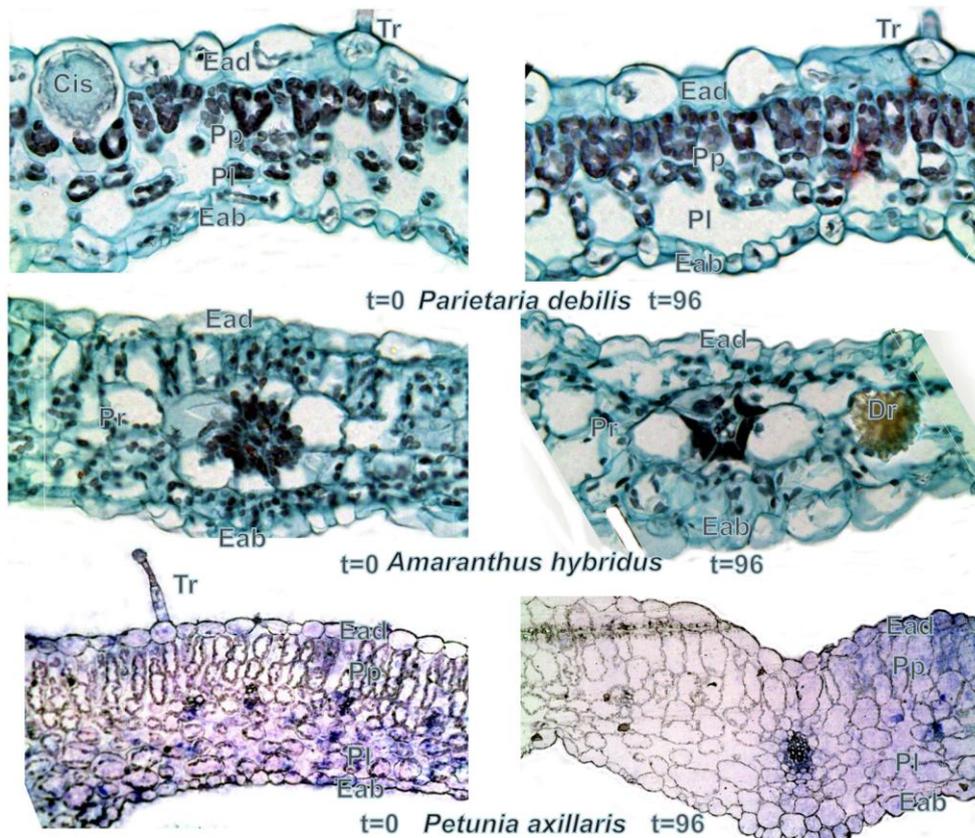


Figura 3.3: Cortes anatómicos de *Parietaria debilis*, *Amaranthus hybridus* y *Petunia axillaris* 0 y 96 horas post aplicación de glifosato. Referencias: Cis, Cistolito; Dr, Drusa; Eab, Epidermis abaxial; Ead, Epidermis adaxial; Pl, Parénquima lagunoso; Pp, Parénquima en empalizada; Pr, Parénquima radiado; Tr, Tricoma.

Parietaria debilis al igual que *A. hybridus* disminuye el espesor total a partir de las 12 horas post aplicación del herbicida, el parénquima esponjoso es el tejido que más disminuye su espesor, aunque no sufren ninguna modificación las epidermis, aún luego de 96 horas.

Discusión

La eficacia del glifosato depende, en primer lugar, de la penetración y absorción por vía foliar del ingrediente activo y finalmente de su translocación hasta el resto de la planta (Shaner, 2009). La superficie foliar es la primera barrera que debe atravesar el glifosato para producir su acción herbicida.

Los tricomas presentes en la superficie foliar pueden interceptar las gotas de una aspersión impidiendo que éstas alcancen la epidermis propiamente dicha, además,

cuando los tricomas son simples y se encuentran en baja densidad las gotas del asperjado pueden adherirse a éstos (Ricotta & Masiunas, 1992). La eficiencia de absorción de herbicidas por los tricomas y la posterior translocación hacia las células epidérmicas es desconocida (Hess & Falk, 1990). De acuerdo con Hull (1970) puede ocurrir una mínima absorción vía tricomas, sin embargo en una revisión hecha por Hess & Falk (1990), observan que siempre existe una correlación negativa entre la adherencia de herbicidas a los tricomas y la eficacia de estos productos. Las hojas con tricomas son consideradas con mayor repelencia al agua que las sin tricomas, especialmente cuando la densidad de tricomas es mayor a 1 por 25 mm² (Wang & Liu, 2007). La repelencia al agua por parte de los tricomas está asociada con su densidad y el hecho de que los tricomas evitan que las gotas alcancen la superficie foliar, causando baja retención (Xu *et al.*, 2010). En este trabajo en la especie sensible no se encontraron tricomas, mientras que en las especies tolerantes se encontró una cantidad similar para ambas. Esta densidad de tricomas encontrada es alta si la comparamos con la citada para otras especies (Tabla 3.4).

Tabla 3.4: Densidad de estomas y tricomas en la superficie adaxial de hojas de malezas (Ferreira *et al.*, 2002a; b, 2003; Procópio *et al.*, 2003b; a; Huangfu *et al.*, 2009).

Especie	Tricomas/mm ²	Estomas/mm ²
<i>Leonurus sibiricus</i>	62,4	0
<i>Leonotis nepetaefolia</i>	110,4	60
<i>Plantago tomentosa</i>	3,4	100
<i>Sida glaziovii</i>	33,8	86
<i>Bidens pilosa</i>	18,8	45
<i>Emilia sonchifolia</i>	1,8	66
<i>Ageratum conyzoides</i>	3,6	60
<i>Amaranthus deflexus</i>	1,0	105
<i>Amaranthus spinosus</i>	0,0	156
<i>Alternanthera tenella</i>	5,2	106
<i>Euphorbia heterophylla</i>	1,0	138
<i>Nicandra physaloides</i>	5,2	98
<i>Solanum viarum</i>	4,8	16
<i>Solanum americanum</i>	1,6	27
<i>Raphanus raphanistrum</i>	1,0	236
<i>Sonchus asper</i>	0	118
<i>Brassica Juncea</i>	-	185 – 470

Algunos estudios indican que los herbicidas pueden ser absorbidos a través de los estomas (Wanamarta & Penner, 1989), una menor cantidad de estomas en la superficie adaxial disminuiría la infiltración por esta vía. La razón por la que puede producirse una penetración diferencial en los estomas comparado con el resto de la cutícula es que las ceras son algo más delgadas y permeables alrededor de las células oclusivas (Hess & Falk, 1990). Siendo así, los estomas pueden cobrar importancia en la absorción foliar mientras las ceras epicuticulares tengan un carácter más hidrofílico, aunque según (Eichert & Burkhardt, 2001) solo el 10 % de los estomas contribuyen a la absorción foliar. Las especies analizadas muestran una alta densidad estomática comparada con otras especies de malezas (Tabla 3.4), probablemente debido a que las plantas utilizadas para las mediciones crecieron en ambientes protegidos y esto puede tener como consecuencia que desarrolle mayor número de estomas que un individuo expuesto a condiciones de campo. *Parietaria debilis* es la especie con los valores más altos, lo que puede estar relacionado con que es una especie que habitualmente crece en ambientes sombreados. Pese a esto, la especie presenta los menores valores de absorción de glifosato (Capítulo 2), en este caso la densidad estomática no tendría una correlación con la absorción de glifosato, a pesar de que algunos autores sostienen que especies con alta densidad estomática en la cada adaxial de sus hojas, deberían poder absorber herbicidas más fácilmente (Chachalis *et al.*, 2001). En otras especies no se encontraron relaciones claras entre el número de estomas y la menor sensibilidad al glifosato, como es el caso de distintas poblaciones de *Brassica juncea* (L.) Czern. (Huangfu *et al.*, 2009); mientras que en *Lolium multiflorum* Lam. existieron diferencias significativa en el índice estomático entre biotipos siendo menor este valor en la planta sensible (Galvani *et al.*, 2012). En base a lo encontrado en las especies abarcadas por

este trabajo, más los resultados obtenidos para otras especies, no es posible realizar una correlación entre la sensibilidad al glifosato y la cantidad de estomas en estas especies.

La cantidad y composición química de las ceras epicuticulares es variable entre las distintas especies, como así también dentro de una misma especie, puede variar según la edad o las condiciones de crecimiento. El contenido de ceras epicuticulares en la mayoría de las especies varía entre 10 y 200 $\mu\text{g cm}^2$ (Mcwhorter & Ouzts, 1994), aunque se han reportado valores de más de 300 $\mu\text{g cm}^2$ (Baker, 1982). En el presente trabajo la cantidad de ceras sólo fue significativamente distinta y mayor en *Petunia axillaris*, sin embargo, como se concluye en el Capítulo 2, esta especie no presenta una menor absorción del herbicida, aunque sí presenta un tiempo mayor en el que se produce la penetración del glifosato, por tanto esta mayor cantidad de ceras podría estar implicada en el tiempo necesario para la absorción del glifosato.

En forma general, las ceras están compuestas por distintas proporciones de ésteres, alcoholes y ácidos grasos. Los alcoholes y ésteres tienen carácter hidrofílicos, por el contrario, los ácidos grasos otorgan un carácter hidrofóbico (Monquero *et al.*, 2004a). *Parietaria debilis* absorbe una cantidad considerablemente menor de herbicida que la especie sensible utilizada como control (Capítulo 2) y esta característica podría explicarse por la composición, donde la proporción menor de ésteres y la mayor proporción de ácidos grasos le otorgaría un carácter menos hidrofílico.

Luego de atravesar las barreras que controlan el ingreso del glifosato a la planta, una vez dentro del mesófilo este herbicida debe llegar al floema para ser translocado, Shanner (2009) propone que la falta de translocación podría darse porque existe una barrera que impide el paso desde las células del mesófilo a los elementos conductores del floema, y afectaría más al transporte activo que al que se produce por flujo masal. Galvani *et al.* (2012) consideran que una mayor cantidad de espacios intercelulares en el

mesófilo, así como una menor cantidad de floema en relación con el xilema puede colaborar en la menor sensibilidad al herbicida glifosato de los biotipos resistentes.

Con respecto al estudio anatómico, la falta de variaciones, más allá de las descritas, posiblemente se debe a que los períodos de muestreo, abarcaron poco tiempo (96 horas), lo cual no fue suficiente para la manifestación de daño en las especies. En todas las especies a las que se le realiza la aplicación de glifosato los síntomas externos se comienzan a apreciar entre los 5 y 10 días post aplicación (Dellaferera, 2007; Tuffi Santos *et al.*, 2009; Panigo *et al.*, 2012). Las respuestas anatómicas reportadas en la bibliografía, en general corresponden a períodos de muestreos coincidentes con la aparición de los síntomas o aún posterior a ellos. Sin embargo, a las 12 hs tanto para la especie sensible como para la que resultó más tolerante (Capítulo 1), se observa uno de los efectos que describe la bibliografía y que se relaciona con el colapso del parénquima lagunoso. En las hojas de *C. benghalensis* y *C. diffusa* Burm. f. los tejidos epidérmicos y vasculares fueron poco afectados mientras que el mesófilo se desorganiza y luego se produce la muerte celular (Tuffi Santos *et al.*, 2004). En *Eucalyptus* la aplicación provocó una disminución en el espesor del parénquima lagunoso, pero al mismo tiempo generó un aumento en el espesor del parénquima empalizada, esto último, según los autores podría estar relacionado con una respuesta a glifosato para compensar la reducción en el área fotosintética producida por la necrosis y senescencia que produce el herbicida (Tuffi Santos *et al.*, 2009). Este tipo de efecto no fue observado en las especies analizadas (Tabla 3.3).

Conclusiones

En *Amaranthus hybridus* solo se puede correlacionar con la absorción herbicida la superficie foliar sin tricomas. La aplicación de glifosato provoca una reducción del espesor de la lamina foliar causado por la reducción de la epidermis adaxial y el parénquima radiado.

Petunia axillaris, por su parte, posee una superficie foliar con alta densidad de tricomas y una cantidad de ceras significativamente mayor que la especie sensible, aunque su composición química resultó similar a la de ésta. No mostró modificaciones en su anatomía foliar luego de la aplicación del herbicida.

Finalmente *Parietaria debilis* también posee una superficie foliar con gran densidad de tricomas, y aunque la cantidad de ceras epicuticulares no es significativamente distinta a la de la especie sensible, sí lo es la composición de las mismas, encontrándose mayor proporción de grupos químicos de carácter hidrofóbico. En la anatomía foliar se puede observar que la aplicación de glifosato provoca una reducción del espesor de lamina foliar debido a la reducción de los espacios del parénquima lagunoso.

En este trabajo la densidad estomática no ha podido ser correlacionada con la sensibilidad al glifosato.

Capítulo 4:

Forma de crecimiento y alteraciones producidas por glifosato en *Petunia axillaris* y *Parietaria debilis*

Resumen

En este capítulo se evalúa la forma de crecimiento normal y su variación ante la aplicación de glifosato en *Petunia axillaris* y *Parietaria debilis*, con el objetivo de determinar sus patrones estructurales y analizar el efecto que la aplicación del herbicida tiene sobre los mismos. El análisis de las formas de crecimiento comprende el estudio de las características exomorfológicas desde la germinación, analizando la variación en las estructuras hasta los 90 días post aplicación de glifosato. Además se analizan los síntomas que el herbicida produce sobre los distintos órganos.

Ambas especies anuales presentan diferentes estrategias de crecimiento inicial, lo que determina que la aplicación de herbicida afecte inicialmente partes diferentes de las plantas. En función de la sintomatología fue posible detectar dos biotipos en *Parietaria debilis*, mientras que en *Petunia axillaris* todos los ejemplares se comportaron de manera similar. Al finalizar el ensayo ambas especies modificaron la longitud y redujeron el número de ejes. En *Petunia axillaris*, además se retrasó la floración, sin embargo aún ante estas modificaciones las plantas sobrevivientes son capaces de dejar descendencia y perpetuar así los genotipos menos sensibles.

Introducción

La morfología vegetal tradicionalmente ha basado sus enfoques en órganos aislados ignorando los aspectos integrales y dinámicos del crecimiento, sin embargo, esto ha sido revertido en los últimos años, lográndose una completa cartografía de la estructura del vegetal y una mejor comprensión de la estrategia de crecimiento de las especies (Perreta & Vegetti, 2005). La forma de crecimiento es el conjunto de aquellas características que definen el hábito de una planta, lo que implica una integración espacial y temporal a su ambiente (Meusel, 1970). La disposición espacio-temporal de los vástagos sobre el eje madre junto a la variación morfológica de dichos vástagos,

constituye una de las mayores determinantes de la variación de la estructura del sistema de ramificación y, consecuentemente, de la forma de crecimiento de las especies (Mühlberg, 1970; Moore & Moser, 1995; Vegetti, 1997). Esta forma es el resultado del equilibrio entre los procesos endógenos de crecimiento y las acciones exteriores ejercidas por el ambiente, y se manifiesta por la disposición relativa de los vástagos vegetativos aéreos y subterráneos (Edelin, 1984).

El análisis de las formas de crecimiento comprende el estudio de las características exomorfológicas y anatómicas; incorporando la relación con el ambiente (Grosso, 2001). No sólo abarca las características de un individuo adulto, sino que también incorpora las etapas que se suceden desde la germinación; involucra una descripción ordenada y coordinada de eventos morfogénicos (Bell, 1986). Permite un análisis integral del conjunto de caracteres vegetativos y reproductivos, que varían sólo dentro de un rango específico de plasticidad fenotípica (Dengler, 1994; Grosso, 2001). El estudio de las formas a partir de principios dinámicos de construcción es inicialmente cualitativo, pero provee información básica que permite la cuantificación (Barthélémy, 2000).

Este enfoque morfológico y dinámico constituye una herramienta que permite esclarecer las distintas adaptaciones que presentan las especies en lo que concierne a la ocupación del espacio, competencia y resistencia a perturbaciones (Fournier, 1982; Barthélémy & Caraglio, 2007). Las investigaciones en formas de crecimiento son la base de muchos estudios fitosociológicos, de ecología de poblaciones y comunidades, y biogeográficos (Krumhiegel, 1998); y permiten comprender e interpretar relaciones ecológicas (Hagemann, 1981) y su correlación, por ejemplo con la dispersión (Bernard, 1990); puede ser aplicado a plantas que crecen en condiciones naturales o modificadas

por el hombre, a estudios agronómicos (Meusel *et al.*, 1977) o de manejo productivo de especies nativas (Montenegro & Ginocchio, 1992).

El conocimiento de la morfología y la anatomía de especies de difícil control es un herramienta de gran valor para lograr el control de las mismas (Kraus *et al.*, 2007). Entre las especies de malezas son tolerantes aquellas que nunca han sido controladas por un herbicida determinado (WSSA terminology committee, 1998). La tolerancia puede estar relacionada con características histoquímicas que reducen la penetración y/o translocación del herbicida (Monquero, 2003; Cruz-Hipolito *et al.*, 2009), con la existencia de metabolismos diferenciales o variaciones en la actividad de determinadas enzimas (Monquero, 2003), con formas de crecimiento que posibilitan la sobrevivencia de yemas que aseguran el rebrote posterior a la aplicación (Malpassi, 2004; Panigo *et al.*, 2012) o con la presencia de órganos de reserva que posibiliten la recuperación post-aplicación (Panigo *et al.*, 2011).

Los síntomas típicos producidos por el glifosato, son la detención del crecimiento y clorosis en las hojas, seguida luego de necrosis de tejidos y marchitamiento de la planta; en algunas especies el follaje se torna de color rojizo (Tuesca & Nisensohn, 2004). Dichos síntomas son más acentuados y ocurren primero en el ápice y zonas meristemáticas, luego se extienden a partes más viejas de las plantas. Con frecuencia los rebrotes en especies perennes muestran hojas malformadas y estriadas (Garcia-Torres & Fernandez-Quintanilla, 1989). Una planta que sobrevive a la acción de un herbicida modifica su comportamiento debido principalmente a la acción ejercida por el herbicida sobre los meristemas (Meusel *et al.*, 1977), variando su respuesta fisiológica y redirigiendo el crecimiento a meristemas remanentes (Malpassi, 2004). Esto último se verá reflejado en la estructura de la planta (Barthélémy, 2000). Estudios más detallados que permitan comprender el comportamiento de las malezas,

son esenciales para asumir los retos de una agricultura más sostenible (Kraus *et al.*, 2007). Existe buena cantidad de información sobre los aspectos de control, dosis de herbicidas, combinaciones de herbicidas con diferente tipo de acción y utilización de coadyuvantes para el control de malezas tolerantes (Monquero, 2003; Rainero, 2004; Puricelli & Faccini, 2005), sin embargo, para *Parietaria debilis* y *Petunia axillaris* no se dispone de trabajos que hayan abordado el estudio en detalle de las características arquitecturales y de crecimiento que permitan determinar sus posibles estrategias de escape a la aplicación del herbicida. Teniendo en cuenta lo anteriormente expuesto y considerando el problema que representan las especies elegidas como malezas invasoras de campos dedicados a la siembra directa con aplicaciones intensivas de glifosato, este trabajo aborda el estudio de sus sistemas de ramificación desde la germinación, a fin de determinar sus patrones estructurales y analizar el efecto que la aplicación de glifosato tiene sobre los mismos.

Metodología

Se cultivaron plantas de *Parietaria debilis* y *Petunia axillaris*. Las semillas de todos los individuos fueron colectadas de poblaciones de campos ubicados en la ciudad de Esperanza (31° 26´S y 60° 56´W). Todas las semillas germinaron en papel de filtro húmedo dentro de placas de Petri, luego fueron trasplantadas a macetas que contenían una mezcla de turba y tierra (1:2 v/v) en sala de crecimiento a una temperatura de 28/18°C (día y noche) con un fotoperíodo de 16 h y una intensidad lumínica de 500 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ con 60 – 80 % de humedad relativa.

En los ejemplares cultivados se registró la aparición de órganos y su posición, así como también su desarrollo en el tiempo, desde la germinación, cada dos días hasta la floración. Después de la floración las mediciones fueron realizadas semanalmente. El

tamaño de los distintos órganos se registró cuando éstos habían cesado su elongación.

Para toda la información presentada en este trabajo los nudos se numeran de la siguiente forma: el nudo cero corresponde al nudo cotiledonar en el eje principal y al profilar en las ramificaciones, nudo uno y nudo dos corresponden al primero y segundo nudo respectivamente y así sucesivamente, la numeración se continúa en los nudos siguientes. Para las estructuras foliares la hoja uno corresponde al nomófilo del nudo uno, etc.

Además, para lograr una completa caracterización de la estructura de ambas especies, se diseccionaron ejemplares provenientes de cámara de crecimiento y material coleccionado a campo en distintos estados de desarrollo, que fue herborizado y posteriormente analizado bajo microscopio estereoscópico.

Para evaluar el efecto de la aplicación de glifosato sobre la forma de crecimiento de *Parietaria debilis* y *Petunia axillaris* se aplicó una dosis de 960 g ia ha^{-1} sobre un grupo de 20 plantas de cada especie y se mantuvo un grupo de control, las plantas crecieron en las condiciones de cámara descritas al inicio de esta sección.

El glifosato utilizado estaba formulado como Roundup® Power (sal isopropanilamina 48% p/v). Todas las aplicaciones se realizaron con una cámara de asperjado de laboratorio equipada con pastillas de abanico plano teejet 8001, calibradas para asperjar 200 L ha^{-1} a una presión de 275 kPa.

En *Petunia axillaris* la aplicación se realizó cuando la planta presentaba entre 9 y 10 hojas expandidas, en estado vegetativo (estructura en forma de roseta). Mientras que en *Parietaria debilis* la dosis analizada se aplicó cuando las plantas poseían 12 hojas y se encontraban iniciando la fase reproductiva, es posible observar el inicio de la formación de los primero primordios florales sobre ramas de primer orden.

Diariamente luego de la aplicación se observó y registró el estado de las plantas

y la aparición de síntomas. Finalmente las plantas sobrevivientes fueron diseccionadas para determinar su estructura a los 90 días de emergencia, se usó el test de t para evaluar diferencias entre los parámetros medidos entre plantas tratadas y plantas no tratadas de cada especie individualmente.

Resultados

Forma de crecimiento de Petunia axillaris

La forma de crecimiento comprende un tallo principal monopodial que desarrolla alrededor de 15 nudos en las condiciones de crecimiento de este trabajo, en la fase vegetativa tiene el aspecto de roseta debido a que no elonga los entrenudos basales (Fig. 4.1).

La ramificación se inicia una vez que el meristema terminal del tallo principal cesa su crecimiento, al producir el nudo 15. El crecimiento de estas ramas es acrópeto, comienza a partir de la yema axilar del nudo tres y hasta el nudo once del tallo principal, produce una rama en cada nudo, con una longitud variable entre 5 y 30 cm según su posición, siendo las ramas superiores más cortas que las inferiores. Las ramas de primer orden desarrollan un sistema simpodial en el cual la yema terminal remata en una flor, del nudo inmediato inferior se desarrolla una rama de segundo orden que rematará también en flor; este comportamiento se repite con el desarrollo de una rama de tercer orden desde el nudo inmediato inferior a esta última flor de la rama de segundo orden. Cada planta desarrolla alrededor de ocho flores en promedio (Fig 4.1).

El desarrollo de ramas permite determinar tres zonas sobre el tallo principal: la primera zona la denominamos de inhibición inferior que abarca desde el nudo cotiledonar hasta el nudo dos inclusive, donde las yemas axilares no se desarrollan; la segunda zona abarca desde el nudo tres hasta el nudo once donde las yemas axilares desarrollan acrópetamente sendas ramas largas; y finalmente la zona más distal del tallo

principal que denominamos zona de inhibición superior donde al igual que en la zona más basal, tampoco se desarrollan ramas (Fig 4.1).

La filotaxis sobre el tallo principal es alterna decusada a partir del nudo uno, sin embargo al no elongarse los entrenudos, los distintos nomófilos rotan su posición en dirección antihoraria a medida que crecen.

Las ramas que se desarrollan sobre el eje principal poseen un crecimiento inicial plagiótropo pero a medida que crecen en longitud se tornan ortótropas, estas ramas largas de primer orden poseen una filotaxis alterna en toda su extensión; las ramas de orden superior no presentan estructuras foliares de ningún tipo, son cortas, rematan en flor y se producen en la región apical.



Figura 4.1: Imagen (arriba) y esquema (abajo) de la forma de crecimiento normal en *Petunia axillaris*, en el esquema solo se representan las primeras 4 ramas desarrolladas. Referencias: if, primordio floral; fl, flor; r1-3, ramas de primero a tercer orden respectivamente; Tp, tallo principal. La barra señala la zonación del eje principal: rojo, zona basal de inhibición; verde, zona media de las ramificaciones; amarillo, zona superior de inhibición.

En condiciones de campo la estructura general descrita presenta mayor cantidad de hojas sobre el eje principal, con un número máximo de 25 hojas. El largo de las ramas basales también es mayor, logra alcanzar más de 40 cm y el orden de ramificación en las ramas florales llega a cuarto. La posición de todas las estructuras y las zonas detectadas tanto en los ejemplares colectados a campo como en las plantas provenientes de cámara de crecimiento, permanece inalterada.

Forma de crecimiento de Parietaria debilis

La especie tiene un sistema de ramificación basítono. Presenta un desarrollo temprano de ramas largas las cuales se diferencian a partir de las yemas axilares de los nudos inferiores; cotiledonar, nudo uno y dos del eje principal y sólo del nudo profilar en las ramas largas de primer orden en adelante. Las ramas largas de primer orden desarrollan ramas basales a partir de la yema axilar de los dos profilos, mientras que las de mayor orden lo hacen sólo del perfilo que se encuentra ubicado en posición interna. Sobre el eje principal entonces nos encontramos con dos zonas, una que abarca desde el nudo cero hasta el nudo tres donde solo se producen ramas largas y otra zona que ocupa desde el nudo cuatro hasta el meristema apical del tallo principal , donde se desarrollan ramas cortas (Fig. 4.2).

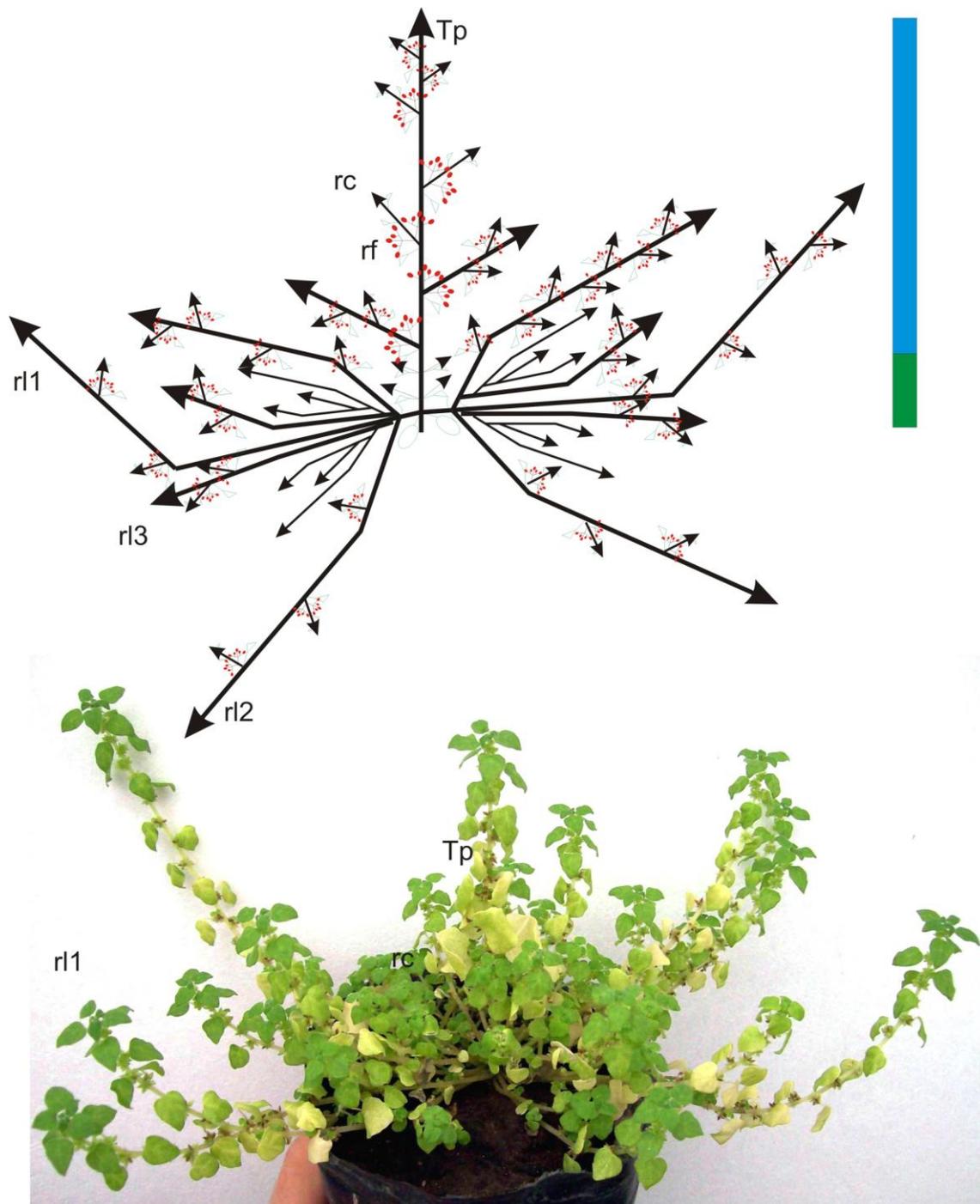


Figura 4.2: Esquema (arriba) e imagen (abajo) de la forma de crecimiento normal en *Parietaria debilis*, en el esquema se representan solo las ramas largas iniciadas en el nudo cotiledonar. Referencias: rc, rama corta; rf, ramita floral; rl1-3, ramas largas de primer a tercer orden respectivamente; Tp, tallo principal. La barra señala la zonación del eje principal: verde, zona de producción de ramas largas; azul, zona de producción de ramas cortas.

La filotaxis del eje principal es opuesta decusada hasta el nudo dos y cambia a alterna dística desde el nudo tres en adelante, esta variación no se aprecia inicialmente dado que los entrenudos correspondientes a las hojas cuatro y seis se elongan en forma tardía. En cambio las ramas basales largas poseen filotaxis alterna en toda su extensión.

Las ramas largas basales poseen un desarrollo inicial plagiótropo, explora la superficie del suelo luego la parte apical se torna ortótropa. El orden de ramificación máximo alcanzado a partir de estas ramas largas basales es de sexto orden, para las condiciones del ensayo. El meristema apical de estas ramas, al igual que el del eje principal, se mantiene en estado vegetativo (Fig. 4.2).

A partir de las yemas axilares del nudo tres del eje principal y de todos los nudos, menos el profilar, de las ramas largas basales se forman acrópetamente ramas cortas. Cada una de estas ramas cortas presenta dos perfiles, un número de hojas variable según el estado de desarrollo (entre dos y tres a los 90 días de crecimiento) y un ápice en estado vegetativo. A partir de las yemas axilares de los perfiles de estas ramas se desarrollan ramitas que poseen dos perfiles y una flor en posición terminal. Estas ramitas florales desarrollan a partir de sus yemas perfilares nuevas ramitas florales, hasta llegar al sexto orden, sin embargo a partir del segundo orden sólo desarrolla la yema axilar del perfilo interno (Fig. 4.3.).

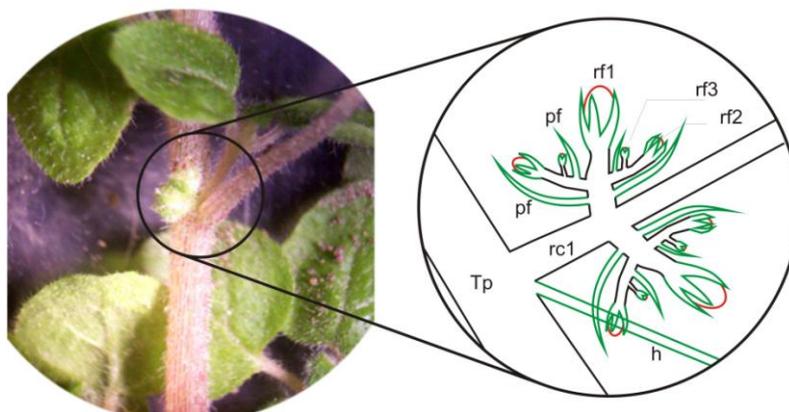


Figura 4.3: Desarrollo de ramas florales en *Parietaria debilis*. Referencias: rc1, rama corta de primer orden; rf1-3, ramitas florales de orden 1 a 3; h, hoja; Tp, tallo principal.

Consecuentemente, la especie presenta tres tipos de ramas que se distinguen por su posición, y por el tipo de estructura producida a partir de sus yemas axilares. El primer tipo se ubica en la región basal de los ejes (principal hasta nudo dos y en los de mayor orden sólo nudo profilar) y desarrolla nuevas ramas largas basales desde sus

yemas axilares profílicas y ramas cortas en las yemas axilares de las hojas restantes. Este tipo de ramas largas basales produce gran cantidad de hojas (Cuadro 4.1). La zona donde se ubican las ramas cortas posee filotaxis alterna. El otro tipo de ramas, de crecimiento más limitado, desarrolla ramitas florales desde las yemas axilares profílicas, y nuevas ramas cortas desde el resto de sus yemas axilares (Cuadro 4.1); posee menor número de hojas que las ramas basales largas. El último tipo de ramas lo constituyen las ramitas florales que de sus yemas profílicas desarrollan sólo ramitas florales, no poseen otra estructura foliar más que los profilos, a través del desarrollo de nuevas ramas en la axila del perfilo originan una estructura reproductiva cimosa que puede constar hasta de 11 flores.

Cuadro 4.1: Estructura de los distintos tipos de ramas observados en *Parietaria debilis*.

	Ramas Largas	Ramas cortas	Ramitas florales
Producción de las yemas profílicas	Ramas largas	Ramitas florales	Ramitas florales
Posición	Nudo cotiledonar hasta nudo 2 en el eje principal y nudo profilar de ramas largas	Nudo 3 y siguientes en el eje principal y todos los nudos excepto el profilar de todas las ramas largas y cortas	Axila de los profilos de ramas cortas y de ramitas florales de menor orden
Número de nudos	Hasta 30 nudos	Hasta 4 nudos	Sólo nudo profilar

En condiciones de campo la cantidad de entrenudos y el orden de ramificación fue menor para todos los tipos de ramas. Otra característica observada en los ejemplares de mayor edad herborizados fue, en varios casos, la pérdida de la porción distal con ramas cortas, permanecen sobre las ramas largas y el eje principal sólo las estructuras reproductivas mostrando la planta un aspecto diferente. Los casos más extremos lo presentaron ejemplares hallados en la ciudad, que por encontrarse al reparo de las heladas continuaron su ciclo de crecimiento durante más de una temporada, éstos mostraron un comportamiento similar aunque con un número mucho mayor de entrenudos en el eje principal, ramas largas y cortas.

Efecto de la aplicación de glifosato sobre la forma de crecimiento de Petunia axillaris

Al segundo día post aplicación comienza a apreciarse una clorosis en la zona más apical del tallo principal, el día nueve termina de extenderse esta misma sintomatología a las últimas hojas expandidas, sólo en la región basal de las mismas. Mientras tanto las hojas basales permanecen con color verde similar al de las plantas no tratadas, finalmente el día 14 se aprecia que los entrenudos de la porción más apical del tallo principal comienzan a elongarse, exhibiendo un comportamiento diferencial al observado en las plantas no tratadas (Cuadro 4.2).

Cuadro 4.2: Sintomatología postaplicación de glifosato en plantas de *Petunia axillaris*.

Días postaplicación	960 [g.i.a.ha ⁻¹]
2	Sin síntomas
3	Clorosis primordios foliares apicales
6	Clorosis hojas apicales
9	Clorosis zona apical
13	Manchas necróticas en hojas apicales
14	Elongación de entrenudos apicales del tallo principal

La aplicación de glifosato modifica el comportamiento del tallo principal, provocando la elongación de ramas florales desde su extremo apical ubicado por encima del nudo 15 (último nudo al momento de la aplicación). La elongación de entrenudos del tallo principal origina una nueva zona de producción de ramas florales de estructura similar a las ramas basales (Fig. 4.4).



Figura 4.4: Imagen (arriba) y esquema (abajo) de plantas de *Petunia axillaris* con aplicación de 960 g ia ha^{-1} de glifosato; en el esquema solo se representan las primeras 4 ramas desarrolladas. Referencias: if: primordio floral; fl: flor; r1-3: ramas largas de primer a tercer orden respectivamente; Tp: tallo principal. La barra señala la zonación de eje principal: rojo, zona basal de inhibición; verde, zona media de las ramificaciones; amarillo, zona de inhibición, azul, región apical de eje que desarrolla flor en posición terminal.

Las ramas basales también se modifican reduciendo su largo y orden de ramificación. Estas ramas retrasan el momento en el que desarrollan flores, por tanto al

momento de muestreo de estructuras, las plantas tratadas presentaban un número menor de flores que las plantas testigo (Cuadro 4.3).

Cuadro 4.3: Variaciones estructurales observadas en plantas de *Petunia axillaris* tratadas con 960 [g.i.a.ha⁻¹], a los 90 días de emergencia, el valor de p es el nivel de probabilidad de significancia de cada parámetro.

	Plantas no tratadas	Plantas tratadas	Probabilidad (valor de p)
Entrenudos del tallo principal	No elongados	elongados	-
Número de ramas basales	7,25	18,50	0,0001
Longitud de ramas basales	27,05	15,66	0,0267
Número de flores	8,25	3,00	0,0072

Efecto de la aplicación de glifosato sobre la forma de crecimiento de Parietaria debilis

El tercer día después de la aplicación se observa clorosis en las zonas meristemáticas que se generaliza a toda la planta el día sexto. El día séptimo comienza a apreciarse una coloración rojiza en las hojas, primero en los pecíolos, en días posteriores se extiende a los bordes de las láminas y finalmente en la lámina completa. En algunos casos también se observan manchas necróticas muy reducidas. Además se interrumpe la expansión foliar no así la elongación de entrenudos, los que en ningún momento detienen su crecimiento.

El análisis diario de los síntomas post aplicación (Cuadro 4.4) permitió detectar dos grupos de plantas. El primer grupo comienza a mostrar síntomas necróticos en el tallo principal en la zona ubicada entre el nudo cotiledonar y el segundo nudo, lo que es acompañado por una marchitez general que lleva a una senescencia total luego de cuatro días de observado el síntoma (Cuadro 4.4). Este comportamiento sólo lo presenta el 30% de los ejemplares. El segundo grupo (correspondiente al 70 % de las plantas) mantiene la coloración rojiza de las hojas ya expandidas, las que finalmente se tornan cloróticas o senescen días después. Las hojas que estaban en expansión al momento de la aplicación continúan desarrollando y muestran alteraciones en su forma y manchas cloróticas en sus bordes, los entrenudos de esta zona presentan menor longitud que en el

testigo. Las hojas que se diferencian posteriormente son de forma y coloración normal, y la longitud de los entrenudos es similar a la observada en plantas testigo.

Cuadro 4.4: Síntomas producidos por la aplicación de diferentes dosis de glifosato a plantas de 12 hojas de *Parietaria debilis*.

Días postaplicación	960 [g.i.a.ha ⁻¹] Respuesta 1	960 [g.i.a.ha ⁻¹] Respuesta 2
2	Sin síntomas	Sin síntomas
3	Clorosis zona apical	Clorosis zona apical
5	Clorosis general	Clorosis zona apical
6	Clorosis general	Clorosis general
7	Pecíolos rojizos	Pecíolos rojizos
8	Nervaduras rojizas	Nervaduras rojizas
9	Marchitez General	Nervaduras rojizas
10	Necrosis media	Bordes de láminas rojizos
12	Necrosis media	Láminas rojizas
13	Senescencia	Láminas rojizas
14	Senescencia	Continúa el crecimiento

Las plantas tratadas del segundo grupo que mostraron tolerancia a esta dosis, exhiben, sin embargo, menor supervivencia de yemas que producirán ramas largas, respecto a las plantas no tratadas (Cuadro 4.5). Esto hace que los ejemplares sobrevivientes presenten igual estructura que las plantas no tratadas pero más empobrecida (Fig. 4.5). También se ven afectadas las estructuras reproductivas registrándose menor cantidad estimada de semillas producidas (Cuadro 4.5).

Cuadro 4.5: Variaciones estructurales observadas en plantas de *Parietaria debilis* tratadas con 960 [g.i.a.ha⁻¹], a los 90 días de emergencia, el valor de p es el nivel de probabilidad de significancia de cada parámetro.

	Plantas no tratadas	Plantas tratadas	Probabilidad (valor de p)
Número máximo de nudos del eje principal	26,63	21,50	<0,0001
Número máximo de nudos en ramas primarias	30,38	23,38	<0,0001
Orden máximo de ramificación basal	6,00	3,00	-
Orden máximo de ramificación en ramas cortas	2,00	2,00	-
Estimación de producción de semillas	2800 – 3500	1900 – 2300	

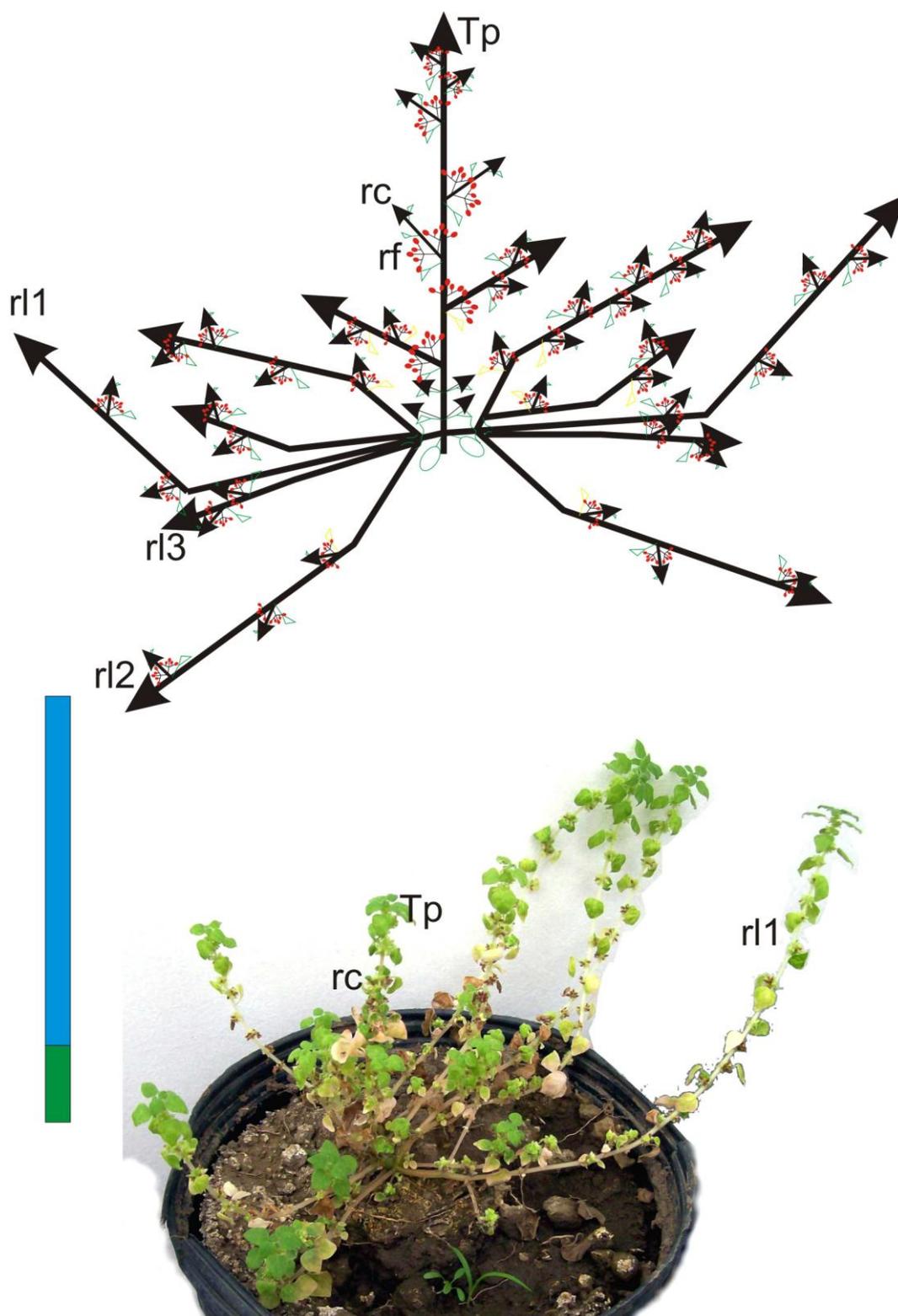


Figura 4.5: Esquema (arriba) e imagen (abajo) de plantas de *Parietaria debilis* con aplicación de 960 g ia ha^{-1} de glifosato. En el esquema se representan solo las ramas largas iniciadas en el nudo cotiledonar. Referencias: rc: rama corta; rf: ramita floral; r1-3: ramas largas de primer a tercer orden respectivamente; Tp: tallo principal. La barra señala la zonación del eje principal: verde, zona de producción de ramas largas; azul, zona de producción de ramas cortas.

Discusión

Los síntomas característicos descritos para plantas tratadas con glifosato, como ser clorosis, necrosis en las hojas y presencia de color rojizo en el follaje (Tuesca & Nisensohn, 2004) fueron observados en las especies estudiadas. Los síntomas de clorosis fueron en general más acentuados y ocurrieron primero en el ápice y zona meristemáticas, luego se extendieron a partes más viejas de las plantas, de igual manera que reportan Tuesca y Nisensohn (2004). En *Petunia axillaris* no se produjo este último efecto ya que las hojas basales no mostraron una coloración distinta a las hojas de las plantas testigo, esta ausencia de sintomatología fue reportada también para biotipos resistentes al glifosato de *Conyza bonariensis* (L.) Cronquist (Chodová *et al.*, 2009). Además se produjo detención total del crecimiento y marchitamiento de algunas plantas de *Parietaria debilis*.

La planta construye su forma a medida que avanza el desarrollo y se establecen las ramificaciones (Barthélemy & Caraglio, 2007). Cuando se aplica un herbicida se crean condiciones ambientales artificiales extremas negativas para el crecimiento y desarrollo de la vegetación (Monquero, 2003; Rodriguez, 2004), por lo que una planta que sobrevive a la acción de un herbicida modifica su comportamiento debido principalmente a la acción ejercida por el herbicida sobre los meristemas (Meusel *et al.*, 1977).

Ambas especies estudiadas en este trabajo fueron afectadas por la dosis herbicida, para *Petunia axillaris* el efecto fue solo morfológico, ya que no se registró la muerte de individuos mientras que para *Parietaria debilis* el 30% de las plantas resultó sensible y el restante 70% sobrevivió. Sobre esta última fracción se registraron también variaciones morfológicas.

Petunia axillaris recupera post aplicación el desarrollo del eje principal que se

había detenido al iniciar la producción de ramas y se retrasa el desarrollo de las ramas basales. En otras especies que han sobrevivido a la aplicación de un herbicida, la respuesta típica es la producción de ramas a partir de yemas axilares que originalmente se encontraban inhibidas en la forma de crecimiento normal para la especie (Malpassi, 2005; Panigo *et al.*, 2012), seguido de la pérdida de la dominancia apical (Hank *et al.*, 2003). En *Petunia axillaris* el eje principal elonga, florece y ramifica sólo en la porción distal, produce ramas cortas que portan flores, hecho que no se ocasiona, al menos tempranamente, en las plantas control. Este fenómeno podría explicarse debido a que el glifosato se transloca hacia las zonas meristemáticas en activo crecimiento de la planta (Shaner, 2009), y en el momento de la aplicación *Petunia axillaris* se encuentra formando las ramas basales, las que retrasan su desarrollo. La nueva región de producción de ramas florales sobre el eje principal puede ser considerada como una zona de enriquecimiento, en esta zona las yemas latentes brotan facultativamente, fuertemente influenciadas por variables ambientales (Rua & Weberling, 1995). Los ejes producidos a partir de la misma aumentan el número de flores, consecuentemente, el número de semillas.

En *Parietaria debilis*, en los ejemplares que toleraron la aplicación de 960 g.i.a.ha⁻¹ de glifosato, se observa una disminución en el número de ramas basales, lo cual indica que las yemas profilares de las ramas basales han sido afectadas. Sin embargo, la zona apical de los ejes se mantiene activa y desarrollan nuevas ramificaciones cortas y ramas florales profilares a partir de éstas. Otro efecto es la disminución de la longitud de los entrenudos de *Parietaria debilis* presentes al momento de la aplicación, lo que ya ha sido reportado para otras especies como *Commelina erecta* L. (Panigo *et al.*, 2012). Esto muestra un efecto negativo del herbicida sobre el crecimiento, afecta igualmente la expansión de las hojas apicales, al

reducir su tamaño y producir deformación de las mismas, posiblemente debido al efecto del herbicida sobre la producción de fotoasimilados que afecta a las hojas expandidas (inicialmente clorosis y finalmente senescencia).

La ramificación en una planta puede cambiar la morfología en función de un estrés ambiental (Cedergreen *et al.*, 2006). Tanto en *Petunia axillaris* como en *Parietaria debilis* la aplicación de glifosato reduce el orden de ramificación máximo logrado en las ramas basales, tanto como la longitud de los ejes, estas ramas son las que se desarrollaban activamente al momento en el que se realizó la aplicación. Cambios de esta naturaleza son netamente cuantitativos, no afectan la forma de la planta, sólo el tamaño, generando estructuras idénticas a las plantas control pero más empobrecidas. La arquitectura elemental se mantiene estable en sus aspectos cualitativos en todos los ambientes donde se desarrolla la especie (Barthélémy, 2000). El ambiente puede provocar mayormente modificaciones cuantitativas sobre la estructura y sólo ante condiciones extremas modificar la expresión de la misma (Barthélémy *et al.*, 1995; Grosfeld *et al.*, 1999).

El hecho de que ambas especies sean anuales; determina en gran medida el tipo de respuesta que muestran post aplicación. En las especies perennes la estrategia de respuesta a disturbios involucra la presencia de yemas axilares que van a producir nuevos ejes vegetativos, para lo cual deben contar con órganos de reservas (Vesk & Westoby, 2004). Este tipo de respuesta puede modificar la estructura de la planta (Panigo *et al.*, 2012). En plantas anuales la estrategia de sobrevivencia involucra cambios estructurales tendientes a aumentar la producción de semillas. La definición de “tolerancia” a un herbicida indica no solo la capacidad de sobrevivir al tratamiento sino que incluye también la capacidad de reproducirse (Baucom & Mauricio, 2007). Esta capacidad podría estar disminuída por la acción herbicida pero como sucede en

Parietaria debilis, la cantidad de semillas producidas seguirá siendo alta. En *Gomphrena perennis* L. también fue afectada su capacidad de generar estructuras reproductivas, sin embargo, la aplicación de glifosato no le impediría alcanzar la reproducción sexual ya que desarrolla al menos el 50% de las inflorescencias UIFs respecto al testigo no tratado (Acosta, 2012), lo cual, al ser una especie perenne, representa un inversión reproductiva significativa que asegura el mantenimiento de un importante banco de semillas.

Las respuestas morfológicas observadas para estas especies no podrían ser catalogadas como estrategias de escape, ya que el herbicida afecta cuantitativamente la estructura, sin embargo, los niveles no son suficientes como para impedir la reproducción y el desarrollo de los ejemplares, posibilitando su persistencia en el sistema.

Conclusión

La regeneración de la población, al ser especies anuales, tiene lugar a través de la producción de semillas. En ambas especies la menor plasticidad de la región basal es compensada por la continuidad de crecimiento de la región distal. A pesar de los sectores de ejes afectados y de la menor cantidad de ramas resultantes en las plantas afectadas de *Parietaria debilis* y el retraso de la floración en *Petunia axillaris*, la producción de semillas y flores en plantas tratadas de ambas especies es elevada y asegura la perpetuación de los genotipos menos sensibles.

Discusión general

El empleo extensivo de glifosato asociado a la siembra directa, es una tecnología cuyas ventajas agronómicas están fuera de discusión, sin embargo, también es cierto que el problema de las malezas no ha desaparecido y en numerosos casos particulares se ha agravado (Vitta *et al.*, 2004a). Los herbicidas ejercen una fuerte presión de selección sobre el agroecosistema (Vitta *et al.*, 2000; Leguizamón & Ferrari, 2005; Christoffoleti *et al.*, 2008). Cuando se aplica un herbicida se crean condiciones ambientales artificiales extremas negativas para el crecimiento y desarrollo de la vegetación (Monquero, 2003; Rodríguez, 2004). Si este ambiente, artificialmente generado, persiste y/o se reitera en el tiempo, se producirá una reducción significativa en la frecuencia de los genotipos susceptibles y un incremento de los tolerantes y/o de los resistentes (Vitta *et al.*, 2004; Christoffoleti *et al.*, 2008). *Petunia axillaris* y *Parietaria debilis* forman parte de esta nueva comunidad de malezas asociadas al cultivo de soja con aplicaciones intensivas de glifosato (Faccini & Puricelli, 2007; Dellaferrera *et al.*, 2009). Ambas pueden ser consideradas tolerantes al herbicida porque han mostrado una baja sensibilidad comparadas con *Amaranthus hybridus*, siendo *Parietaria debilis* la que presentó el mayor factor de tolerancia. Por el contrario la especie *Verbena litoralis* considerada como tolerante en los trabajos de Faccini & Puricelli (2006) fue sensible en las condiciones utilizadas para este estudio (Capítulo 1). El objetivo de esta tesis se centró, una vez comprobada la baja sensibilidad de las especies, en caracterizar los mecanismos de tolerancia al herbicida glifosato en las mismas. Para lograrlo se trabajó sobre varios aspectos: superficie foliar, absorción y translocación, acumulación de ácido shinkímico y variaciones estructurales.

Sorpresivamente los estudios de dosis-respuesta realizados para comprobar la falta de sensibilidad al herbicida de ambas especies, permitieron detectar en *Parietaria debilis* la presencia de efecto de hormesis a bajas dosis (Capítulo 1). Este efecto, no es nuevo para el glifosato y ya ha sido reportado en otras especies (Velini *et al.*, 2010; (Westhoven *et al.*, 2008), sin embargo es preocupante a campo, dado que por problemas o fallas en la aplicación es posible que esas dosis se alcancen a campo estimulando el crecimiento de esta especie. Este efecto, se suma como una alternativa más para que la especie permanezca en el sistema.

El glifosato actúa como herbicida inhibiendo la EPSPs además de los efectos que conllevan a la muerte del vegetal la inhibición de esta ruta tiene como consecuencia la acumulación de ácido shikímico; esta respuesta puede usarse como indicador de la sensibilidad de una especie a la exposición del glifosato (Velini *et al.*, 2008; Sørbye *et al.*, 2011). Al igual que otras especies tolerantes las plantas de *Parietaria debilis* y *Petunia axillaris* tratadas con glifosato no incrementan su concentración de ácido shikímico en comparación con el testigo sin tratar (Capítulo 1), confirmando la baja sensibilidad de las especies. La acumulación de ácido shikímico es un método efectivo y rápido de caracterización de la tolerancia de las especies de malezas al herbicida glifosato.

La eficacia del glifosato depende, en primer lugar, de la absorción por vía foliar del ingrediente activo y finalmente de su translocación hasta el resto de la planta hasta el sitio de acción. La superficie foliar es la primera barrera que debe atravesar el glifosato para producir su acción herbicida. *Parietaria debilis* absorbe una cantidad considerablemente menor de herbicida que la especie testigo (Capítulo 2) y esta característica podría explicarse por la composición de las ceras epicuticulares que le otorgarían un carácter más hidrofóbico (Capítulo 3). En condiciones controladas, la

absorción de glifosato puede continuar más allá del tercer día post aplicación como en *Ipomoea purpurea* (L.) Roth y *Polygonum convolvulus* L. (Sandberg *et al.*, 1980); o no continuar más allá de este período como sucede en *Convolvulus arvensis* L., *Convolvulus sepium* (L.) R. Br. y *Cirsium arvense* (L.) Scop. Para las tres especies, las tolerantes y la sensible analizadas, el patrón de absorción es semejante al segundo grupo ya que el 90 % se absorbe hasta el tercer día, aunque el momento en que se alcanza este porcentaje es diferente entre las especies. *Amaranthus hybridus* y *Parietaria debilis* absorben el 90% del herbicida aplicado a las 23 y 28 horas respectivamente mientras que *Petunia axillaris* lo hace a las 65 horas luego de la aplicación, es en esta última especie donde se encontró una cantidad de ceras significativamente distinta y mayor, por tanto la cantidad mayor de ceras encontrada en esta especie podría ser la razón del mayor tiempo necesario para la absorción del glifosato.

Otra posible explicación a la absorción diferencial entre las especies podría estar relacionada con los tricomas presentes en la superficie foliar estos pueden interceptar las gotas de una aspersión impidiendo que éstas alcancen la epidermis propiamente dicha (Ricotta & Masiunas, 1992). Hess & Falk (1990) observaron que siempre existe una correlación negativa entre la adherencia de herbicidas a los tricomas y la eficacia de estos productos. En este trabajo en la especie sensible no se encontraron tricomas, mientras que en las especies tolerantes se encontró una cantidad similar para ambas, la que comparada con la de otras especies sería entre media y alta (Ferreira *et al.*, 2002a; b, 2003; Procópio *et al.*, 2003b; a; Huangfu *et al.*, 2009). Es importante destacar que aunque la densidad entre las especies tolerantes no muestra diferencias, si las hay en cuanto a la morfología de los tricomas. Si bien consideraciones más allá de la densidad no pueden ser propuestas a partir de los datos obtenidos en esta tesis, estudios celulares de los tricomas serían interesantes ya que más allá del efecto sobre la imposibilidad de

mojado de las células epidérmicas propiamente dichas, también se reporta que cuando los tricomas son simples y se encuentran en baja densidad las gotas del asperjado pueden adherirse a estos (Ricotta & Masiunas, 1992). La retención de gotas por los tricomas podría afectar positivamente la absorción en función de variaciones que pueda presentar en la cutícula que lo recubre o de las características propias como la de ser pelos glandulares (Evert, 2006).

Los estomas también pueden estar implicados en las diferentes velocidades y cantidades de producto absorbido entre las especies. Entre distintas poblaciones de *Brassica juncea* se encontró una correlación positiva entre el número de estomas y la menor sensibilidad al glifosato (Huangfu *et al.*, 2009). En *Parietaria debilis* encontramos la mayor frecuencia estomática por lo que en estas especies no estarían involucrados en un efecto de aumento de la capacidad de absorción.

Luego de atravesar las barreras que controlan el ingreso del glifosato a la planta, una vez dentro del mesófilo este herbicida debe ingresar al floema para ser translocado. Muchas de las especies de malezas que presentan actualmente resistencia al glifosato tienen, como principal mecanismo responsable de esta resistencia una translocación limitada hacia los meristemas (Shaner, 2009). En especies tolerantes también se describe a este proceso como uno de los principales factores que determinan la baja susceptibilidad al herbicida (Cruz-Hipolito *et al.*, 2009, 2011; Rojano-Delgado *et al.*, 2012), al menos sobre el conjunto de las especies actualmente estudiadas.

En *Parietaria debilis* la translocación es sensiblemente menor que en la especie testigo (Capítulo 2) y los valores estimados se encuentran por debajo de los reportados para todas las especies susceptibles y entre los valores más bajos de las especies resistentes o tolerantes citadas (Cruz-Hipolito *et al.*, 2009; Dinelli *et al.*, 2008;

González-Torralva *et al.*, 2010; Koger & Reddy, 2005; Perez-Jones *et al.*, 2007; Rojano-Delgado *et al.*, 2012).

Petunia axillaris a pesar de tener una translocación similar a la especie sensible posee un patrón distinto de acumulación, visualizándose en la figura 2.3 que el herbicida radiomarcado está acumulado en las hojas más jóvenes, no apreciándose acumulación en las hojas más viejas; este efecto también se observa exteriormente a través de la falta de síntomas post aplicación en las hojas basales de la roseta (Capítulo 4). Similar comportamiento fue observado en plantas de *Lolium rigidum* en las cuales biotipos sensibles y resistentes poseían una fracción similar de herbicida translocado pero mientras el biotipo sensible tuvo mayor acumulación en las bases de las hojas y raíces, el biotipo resistente acumuló mayor cantidad de herbicida en la zona apical de las láminas foliares (Lorraine-Colwill *et al.*, 2002).

Shanner (2009) propone que la falta de translocación podría darse porque existe una barrera que impide el paso desde las células del mesófilo a los elementos conductores del floema, y afectaría mayormente el transporte activo que el que se produce por flujo masal. Galvani *et al.* (2012) consideran que una mayor cantidad de espacios intercelulares en el mesófilo, así como una menor cantidad de floema en relación con el xilema puede colaborar en la menor sensibilidad al herbicida glifosato de los biotipos resistentes.

En ecología la tolerancia ha sido definida como una característica que no previene a la planta de ser dañada, pero le permite compensar el daño producido por algún factor externo (Mauricio, 2000). A pesar de que en *Parietaria debilis* las ramas en cuanto a su número y tamaño resultan afectadas por la aplicación de glifosato y a pesar del retraso de la floración en *Petunia axillaris*, la producción de semillas y flores en plantas tratadas de ambas especies es elevada y asegura la perpetuación de los

genotipos menos sensibles. En *Parietaria debilis* se observó una mayor plasticidad en la zona apical de los ejes que se mantienen activos desarrollando nuevas ramificaciones cortas y ramas florales profilares a partir de éstas. *Petunia axillaris* recupera el desarrollo del eje principal que se había detenido al iniciar la producción de ramas, generando la floración temprana del mismo, junto con el desarrollo de ramas florales axilares sobre el mismo. El glifosato es un herbicida que afecta principalmente zonas meristemáticas (Gougler and Geiger, 1981; Shaner, 2009), sin embargo, la decisión de dónde activar una yema axilar involucra la integración de un amplio rango de factores externos (ambientales) e internos (fisiológicos y de desarrollo) (Leyser, 2009). Condiciones ambientales que limitan el crecimiento o incrementan la tasa de mortalidad pueden favorecer a especies que comienzan la reproducción a tamaños relativamente menores (Bonser & Aarssen, 2009). Tanto *Parietaria debilis* como *Petunia axillaris*, son especies anuales que se reproducen principalmente por semillas, y a pesar de su estructura y su respuesta diferente, en ambas se prioriza la reproducción por sobre la producción de nuevas ramas basales (Capítulo 4).

Respecto al glifosato, además de las estrategias de tolerancia o resistencia, que son abordadas en este trabajo, existen otras estrategias de escape, que también influye en la falta de efectividad de un herbicida (Scursoni *et al.*, 2007). El glifosato no tiene actividad residual; por esta razón, plántulas provenientes de diferentes cohortes pueden “escapar” a la acción del herbicida. Un completo entendimiento de cómo las malezas pueden adaptarse a las aplicaciones de herbicidas requiere que todas las posibles estrategias en las plantas sean examinadas (Acosta, 2012). Tanto la germinación como la emergencia de plántulas son estadíos importantes en el proceso de invasión de las poblaciones (Cousens & Mortimer, 1995), más en especies como las abarcadas por este

trabajo donde las semillas se constituyen en su principal reservorio para la siguiente estación.

Conclusiones

Las especies *Petunia axillaris* y *Parietaria debilis* mostraron una sensibilidad menor al glifosato que la especie utilizada como patrón sensible, además no mostraron inhibida la ruta metabólica sobre la que actúa este herbicida pudiendo catalogarse por tanto como especies tolerantes al glifosato.

Parietaria debilis absorbe una cantidad significativamente menor de glifosato que la especie sensible lo que puede relacionarse con una composición más hidrofóbica de sus ceras epicuticulares, además, del herbicida que efectivamente ingresa a la planta una fracción muy reducida es translocada.

Por otra parte *Petunia axillaris* a pesar de absorber cantidades similares de glifosato que *Amaranthus hybridus* lo hace en un tiempo mayor lo que podría tener correlación con una cantidad mayor de ceras en la primer especie. También la translocación se produce en un mayor tiempo, lo cual está ligado directamente a la tasa de absorción.

La regeneración de las poblaciones, al ser dos especies anuales, tiene lugar a través de la producción de semillas. A pesar de que en *Parietaria debilis* las ramas en cuanto a su número y tamaño resultan afectadas por la aplicación de glifosato y a pesar del retraso de la floración en *Petunia axillaris*, la producción de semillas y flores en plantas tratadas de ambas especies es elevada y asegura la perpetuación de los genotipos menos sensibles.

Bibliografía

- Abramoff, M.D., P.J. Magalhães, & S.J. Ram. 2004. Image processing with Image J. *Biophotonics international* 11(7): 36–42.
- Acosta, J.M. 2012. Arquitectura y modelos de crecimiento de malezas tolerantes a glifosato. Caracterización de las posibles estrategias de escape a la acción herbicida.
- Arregui, M.C., & E. Puricelli. 2008. Mecanismo de acción de plaguicidas. Dow AgroScience Argentina S.A.
- Arregui, M.C., R. Scotta, & D. Sánchez. 2006. Improved weed control with broadleaved herbicides in glyphosate-tolerant soybean (*Glycine max*). *Crop Protection* 25(7): 653–656.
- Baker, E.A. 1982. Chemistry and morphology of plant epicuticular waxes. p. 140–161. *In* The plant cuticle. Cutler, D. F.; Alvin, K. L.; Price, C. E. (Eds.). London Academic Press, London.
- Bariuan, J.V., K.N. Reddy, & G.D. Wills. 1999. Glyphosate Injury, Rainfastness, Absorption, and Translocation in Purple Nutsedge (*Cyperus rotundus*). *Weed Technology* 13(1): 112–119.
- Barthélémy D, Sabatier SA & O. Pascal. 1995. Le developpement architectural du noyer commun *Juglans regia* L. (Juglandaceae). *Foret Entreprise*. 103:61–68.
- Barthélémy, D. 2000. Análisis, Modelización y Simulación Informática de la Arquitectura de las Plantas: Aplicaciones Agronómicas y Paisajistas. p. 45–77. *In* Ciudades Arboladas para el siglo XXI. Ponencias del IV Congreso Isa Europeo y V Español De Arboricultura. La Poble Llarga. Valencia., Valencia, España.
- Barthélémy, D., & Y. Caraglio. 2007. Plant Architecture: A Dynamic, Multilevel and Comprehensive Approach to Plant Form, Structure and Ontogeny. *Ann Bot* 99(3): 375–407.
- Barthlott, W., & C. Neinhuis. 1997. Purity of the sacred lotus, or escape from contamination in biological surfaces. *Planta* 202(1): 1–8.
- Barthlott, W., C. Neinhuis, D. Cutler, F. Ditsch, I. Meusel, I. Theisen, & H. Wilhelm. 1998. Classification and terminology of plant epicuticular waxes. *Botanical Journal of the Linnean Society* 126(3): 237–260.
- Baucom RS & R. Mauricio. 2007. The evolution of novel herbicide tolerance in a noxious weed: the geographic mosaic of selection. *Evolutionary Ecology*. 22:85–101.
- Bell, A.D. 1986. The simulation of branching patterns in modular organisms. *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B*. 313: 143–159.

- Belz, R.G., & N. Cedergreen. 2010. Parthenin hormesis in plants depends on growth conditions. *Environmental and Experimental Botany* 69(3): 293–301.
- Bernard, J.H. 1990. Life history and vegetative reproduction in *Carex*. *Canad. J. Bot.* 68: 1441–1448.
- Bonser, S. P. & Aarssen, L. W. 2009. Interpreting reproductive allometry: Individual strategies of allocation explain size-dependent reproduction in plant populations. *Perspectives in Plant Ecology, Evolution and Systematics* 11: 31-40.
- Brain, P., & R. Cousens. 1989. An equation to describe dose responses where there is stimulation of growth at low doses. *Weed Research* 29(2): 93–96.
- Bromilow, R.H., & K. Chamberlain. 2000. The herbicide glyphosate and related molecules: physicochemical and structural factors determining their mobility in phloem. *Pest Management Science* 56(4): 368–373.
- Bukovac, M.J. 1976. Herbicide entry into plants. p. 335–364. *In* *Herbicides: Physiology, Biochemistry, Ecology*,. Audus L.J. Academic Press, New York, New York.
- Burke, I.C., C.H. Koger, K.N. Reddy, & J.W. Wilcut. 2007. Reduced Translocation Is the Cause of Antagonism of Glyphosate by MSMA in Browntop Millet (*Brachiaria ramosa*) and Palmer Amaranth (*Amaranthus palmerii*). *Weed Technology* 21(1): 166–170.
- Cabanne, Gaudry, & Streibig. 1999. Influence of alkyl oleates on efficacy of phenmedipham applied as an acetone:water solution on *Galium aparine*. *Weed Research* 39(1): 57–67.
- Cabrera, A. 1967. Flora de la provincia de Buenos Aires. Colección científica del INTA (III), Buenos Aires, Argentina.
- Calabrese, E.J. 2008. Hormesis: why it is important to toxicology and toxicologists. *Environ. Toxicol. Chem.* 27(7): 1451–1474.
- Calabrese, E.J., & R.B. Blain. 2011. The hormesis database: The occurrence of hormetic dose responses in the toxicological literature. *Regulatory Toxicology and Pharmacology* 61(1): 73–81.
- Caseley, J.C 1996. Herbicidas. In: Labrada, R., J.C. Caseley y C. Parker, eds. *Manejo de malezas para países en desarrollo. Estudio FAO Producción y Protección Vegetal* 120. Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación. Roma, Italia.
- Cedergreen, N., & C.F. Olesen. 2010. Can glyphosate stimulate photosynthesis? *Pesticide Biochemistry and Physiology* 96(3): 140–148.
- Cedergreen, N., J.C. Streibig, P. Kudsk, S.K. Mathiassen, & S.O. Duke. 2006. The Occurrence of Hormesis in Plants and Algae. *Dose Response* 5(2): 150–162.

- Cerdeira, A.L., D.L.P. Gazziero, S.O. Duke, & M.B. Matallo. 2011. Agricultural Impacts of Glyphosate-Resistant Soybean Cultivation in South America. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 59(11): 5799–5807.
- Chachalis, D., K.N. Reddy, C.D. Elmore, & M.L. Steele. 2001. Herbicide efficacy, leaf structure, and spray droplet contact angle among *Ipomoea* species and smallflower morningglory. *Weed Science* 49(5): 628–634.
- Chodová, D., J. Salava, O. Martinová, & M. Cvikrová. 2009. Horseweed with Reduced Susceptibility to Glyphosate Found in the Czech Republic. *J. Agric. Food Chem.* 57(15): 6957–6961.
- Christoffoleti, P.J., A.J. Galli, S.J. Carvalho, M.S. Moreira, M. Nicolai, L.L. Foloni, B.A. Martins, & D.N. Ribeiro. 2008. Glyphosate sustainability in South American cropping systems. *Pest Management Science* 64(4): 422–427.
- Costa, N.V., D. Martins, R.A. Rodella, & A.C.P. Rodrigues. 2011. Alterações anatômicas do limbo foliar de plantas de *Eichhornia crassipes* (Mart.) Solms submetidas à aplicação de herbicidas. *Planta Daninha* 29(1).
- Cousens, R., & M. Mortimer. 1995. *Dynamics of Weed Populations. Faint, Small Crease to Lower Corner.* Cambridge University Press.
- Cruz-Hipolito, H., M.D. Osuna, A. Heredia, J.P. Ruiz-Santaella, & R. De Prado. 2009. Nontarget Mechanisms Involved in Glyphosate Tolerance Found in *Canavalia ensiformis* Plants. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 57(11): 4844–4848.
- Cruz-Hipolito, H., A. Rojano-Delgado, J.A. Domínguez-Valenzuela, A. Heredia, M.D.L. Castro, & R. Prado. 2011. Glyphosate tolerance by *Clitoria ternatea* and *Neonotonia wightii* plants involves differential absorption and translocation of the herbicide. *Plant and Soil* 347(1-2): 221–230.
- Culpepper, A.S. 2006. Glyphosate-Induced Weed Shifts. *Weed Technology* 20(2): 277–281.
- De Reffye, P., & F. Houllier. 1997. Modelling plant growth and architecture: some recent advances and applications to agronomy and forestry. *Current Science* 73: 984–992.
- De Ruiter, H., A.J.M. Uffing, E. Meinen, & A. Prins. 1990. Influence of surfactants and plant species on leaf retention of spray solutions. *Weed Science* 38: 567–572.
- Della-Cioppa, G., S.C. Bauer, B.K. Klein, D.M. Shah, R.T. Fraley, & G.M. Kishore. 1986. Translocation of the precursor of 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase into chloroplasts of higher plants in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A* 83(18): 6873–6877.
- Dellaferrera, I. 2007. Variación en la forma de crecimiento de *Parietaria debilis* G. Forst. y *Veronica persica* Poir. producida por glifosfato.

- Dellaferrera, I., J.M. Acosta, P. Capellino, & A. Amsler. 2009. Relevamiento de malezas en cultivos de soja en sistema de siembra directa con glifosato del departamento Las Colonias (provincia de Santa Fe). *Revista FAVE - Ciencias Agrarias* 8(1): 7–12.
- Dellaferrera, I., N. Guarise, & A. Amsler. 2007. Relevamiento de malezas en cultivos de soja en sistema de siembra directa con glifosato del departamento San Justo (provincia de Santa Fe). *Revista FAVE - Ciencias Agrarias* 5/6: 15–25.
- Dengler, N.G. 1994. The influence of light on Leaf Development. p. 100–136. *In* M. IQBAL (ed). *Growth Patterns in Vascular Plants*. Dioscorides Press.
- Dimitri, M. J.. 1979. Enciclopedia Argentina de Agricultura y Jardinería. Tomo I - Descripción de las plantas cultivadas. Primer Volumen. Tercera Edición. Editorial ACME S.A.C.I. Buenos Aires.
- Dinelli, I. Marotti, P. Catizone, A. Bonetti, J.M. Urbano, & J. Barnes. 2008. Physiological and molecular basis of glyphosate resistance in *C. bonariensis* (L.) Cronq. biotypes from Spain. *Weed Research* 48: 257.
- Duke, S.O. 2011. Glyphosate Degradation in Glyphosate-Resistant and -Susceptible Crops and Weeds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 59(11): 5835–5841.
- Edelin, C. 1984. L'architecture monopodiale: l' exemple de quelques arbres d'Asie tropicale.
- Eichert, T., & J. Burkhardt. 2001. Quantification of stomatal uptake of ionic solutes using a new model system. *J. Exp. Bot.* 52(357): 771–781.
- Esau, K. 1987. Anatomía de las plantas con semilla. Hemisferio Sur.
- Evert RF. 2006. Esau's Plant Anatomy: Meristems, Cells, and Tissues of the Plant Body: Their Structure, Function, and Development. John Wiley & Sons.
- Faccini, D. 2000. Los Cambios Tecnológicos y Las Nuevas Especies de Malezas en Soja. *Agromensajes* 4: 5–8.
- Faccini, D., & E. Puricelli. 2006. Efecto de la temperatura y de la luz sobre la germinación de *Nicotiana longiflora* Cavaniles y *Oenothera indecora* Camb. *Agriscientia* 23(1): 15–21.
- Faccini, D., and E. Puricelli. 2007. Eficacia de herbicidas según la dosis y el estado de crecimiento de malezas presentes en un suelo en barbecho. *Agriscientia* 24(1): 29–35.
- Fahy, E., S. Subramaniam, R.C. Murphy, M. Nishijima, C.R.H. Raetz, T. Shimizu, F. Spener, G. van Meer, M.J.O. Wakelam, & E.A. Dennis. 2008. Update of the LIPID MAPS comprehensive classification system for lipids. *The Journal of Lipid Research* 50(Supplement): S9–S14.

- Feng, P.C.C., M. Tran, T. Chiu, R. Douglas Sammons, G.R. Heck, & C.A. CaJacob. 2004. Investigations into glyphosate-resistant horseweed (*Conyza canadensis*): retention, uptake, translocation, and metabolism. *Weed Science* 52(4): 498–505.
- Ferreira, E.A., S.O. Procópio, E.A.M. Silva, A.A. Silva, & R.J.N. Rufino. 2002a. Estudos anatômicos de folhas de plantas daninhas: I - *Nicandra physaloides*, *Solanum viarum*, *Solanum americanum* e *Raphanus raphanistrum*. *Planta Daninha* 20(2): 159–167.
- Ferreira, E.A., S.O. Procópio, E.A.M. Silva, A.A. Silva, & R.J.N. Rufino. 2002b. Estudos anatômicos de folhas de espécies de plantas daninhas: II - *Bidens pilosa*, *Emilia sonchifolia*, *Ageratum conyzoides* e *Sonchus asper*. *Planta Daninha* 20(3): 327–335.
- Ferreira, E.A., S.O. Procópio, E.A.M. Silva, A.A. Silva, & R.J.N. Rufino. 2003. Estudos anatômicos de folhas de espécies de plantas daninhas de grande ocorrência no Brasil: IV - *Amaranthus deflexus*, *Amaranthus spinosus*, *Alternanthera tenella* e *Euphorbia heterophylla*. *Planta Daninha* 21(2): 263–271.
- Ferreira, J.F. & K. N. Reddy. 2000. Absorption and translocation of glyphosate in *Erythroxylum coca* and *E. novogranatense*. *Weed Sci.* 48:193–199.
- Fournier, A. 1982. Cycle saisonnier de la biomasse et démographie des feuilles de quelques graminées dans les savanes guinéennes de Ouango-Fitini (Côte d'Ivoire).
- Galvani, J., M.A. Rizzardi, C.M. Carneiro, & M.A. Bianchi. 2012. Leaf anatomy of *Lolium multiflorum* sensitive and resistant to glyphosate. *Planta Daninha* 30(2): 407–413.
- García-Torres, L., & C. Fernandez-Quintanilla. 1989. Fundamentos sobre las malas hierbas y herbicidas. Coedición Ministerios de Agricultura, pesca y alimentación Servicio de extensión agraria y Ediciones Mundi-Prensa, España.
- Gauvrit, C. 2003. Glyphosate Response to Calcium, Ethoxylated Amine Surfactant, and Ammonium Sulfate 1. *Weed technology* 17(4): 799–804.
- Gomez de Enciso, C. 2009. Mecanismos de resistencia de *Parthenium hysterophorus* L. a glifosato, Valle Del Cauca, Colombia.
- González-Torralva, F., H. Cruz-Hipolito, F. Bastida, N. Mülleder, R.J. Smeda, & R. De Prado. 2010. Differential susceptibility to glyphosate among the *Conyza* weed species in Spain. *Journal of agricultural and food chemistry* 58(7): 4361–4366.
- Goodwin, T.W., & E.I. Mercer. 1983. Introduction to plant biochemistry. Pergamon Press.
- Gougler, J.A., & D.R. Geiger. 1981. Uptake and distribution of Nphosphonomethylglycine in sugar beet plants. *Plant physiology* 68:668–672.
- Grosfeld J, Barthélémy D, Brion C. 1999. Architectural variations of *Araucaria araucana* (Molina) K. Koch (Araucariaceae) in its natural habitat. In: Kurmann

- MH, Hemsley AR eds. The evolution of plant architecture. Kew: Royal Botanic Gardens, 109–122.
- Grosfeld, J. 2002. Analisis de la variabilidad morfológica y arquitectural de *Austrocedrus chilensis* (D.Don) Pic. Serm. et Bizzarri, *Fitzroya cupressoides* (Molina) I.M. Johnst., *Pilgerodendron uviferum* (D.Don) Florin y *Cupressus sempervirens* L. (Cupressaceae).
- Grosso, M. 2001. Formas de crecimiento de especies herbáceas y arbustivas a lo largo de un gradiente altitudinal en el área serrana de la provincia de Córdoba. Tesis doctoral. UNRC. Rio Cuarto, Argentina.
- Hagemann, W. 1981. Wuchsformenuntersuchungen an Balkanischen *Hypericum* – sippen. Bot. Jahrb. Syst. 102: 239–254.
- Hank J. Mager, Bryan G. Young, John E. Preece, & Joseph L. Matthews. 2003. Weed behavior following loss of apical dominance. p. 58:83. In North Central Weed Science Proceedings. Champaign, IL. United States.
- Hatterman-Valenti, H., A. Pitty, & M. Owen. 2011. Environmental Effects on Velvetleaf (*Abutilon theophrasti*) Epicuticular Wax Deposition and Herbicide Absorption. Weed Science 59(1): 14–21.
- Herbicide Resistant Plants Committee. 1998. “herbicide resistance”and herbicide tolerance” defined. Weed Technology 12(4): 789–790.
- Herrmann, K.M., & L.M. Weaver. 1999. The shikimate pathway. Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. 50: 473–503.
- Hess, F. D., D. E. Bayer, and R. H. Falk. 1974. Herbicide dispersal patterns: I. As a function of leaf surface. Weed Science. 22:394–401.
- Hess, M., G. Barralis, H. Bleiholder, L. Buhr, T. Eggers, H. Hack, & R. Stauss. 1997. Use of the extended BBCH scale—general for the descriptions of the growth stages of mono; and dicotyledonous weed species. Weed Research 37(6): 433–441.
- Huangfu, C., X. Song, & S. Qiang. 2009. Morphological disparities in the epidermal and anatomical features of the leaf among wild *Brassica juncea* populations. Weed Biology and Management 9(3): 234–242.
- Hull, H.M. 1970. Leaf structure as related to absorption of pesticides and other compounds. Residue Rev 31: 1–150.
- Hull, H., H. Morton, & J. Warrie. 1975. Environmental influences on cuticle development and resultant foliar penetration. The Botanical Review 41: 421–452.
- Jeannoda-Robinson, V. 1977. Contribution à l’étude de l’architecture des herbes. Université de Sciences et Techniques du Languedoc.

- Kitson, F. G., B. S. Larsen, and C. N. McEwen. 1996. Quantitative GC/MS. Pages 35–41 in *Gas Chromatography and Mass Spectrometry: A Practical Guide*. San Diego: Academic Press.
- Kirkwood, R., & I. Mckay. 1994. Accumulation and elimination of herbicides in select crop and weed species. *Pesticide Science* 42: 241–249.
- Klonowski, W. 1999. Non-linearity and Statistics-Implications of Hormesis on Dose-response Analysis. *Biocybernetics and Biomedical Engineering* 19(4): 41–56.
- Knecht, G.N., & E.R. Orton. 1970. Stomate density in relation to winter hardiness of *Ilex opaca* Ait. *Journal of the American Society of Horticultural Science* 95: 341–5.
- Knezevic, S.Z., J.C. Streibig, & C. Ritz. 2007. Utilizing R Software Package for Dose-Response Studies: The Concept and Data Analysis. *Weed Technology* 21(3): 840–848.
- Kniss, A.R., J.D. Vassios, S.J. Nissen, and C. Ritz. 2011. Nonlinear Regression Analysis of Herbicide Absorption Studies. *Weed Science* 59(4): 601–610.
- Koch K & H. Ensikat. 2008. The hydrophobic coatings of plant surfaces: epicuticular wax crystals and their morphologies, crystallinity and molecular self-assembly. *Micron* 39:759–772.
- Koger, C.H., & K.N. Reddy. 2005. Glyphosate efficacy, absorption, and translocation in pitted morningglory (*Ipomoea lacunosa*). *Weed Science* 53(3): 277–283.
- Kraus, T.A., M.A. Grosso, S.C. Basconsuelo, C.A. Bianco, & R.N. Malpassi. 2007. Morphology and anatomy of shoot, root, and propagation systems in *Hoffmannseggia glauca*. *Plant Biol (Stuttg)* 9(6): 705–712.
- Krumbiegel, A. 1998. Growth forms of annual vascular plants in central Europe. *Nord. J. Bot.* 18: 563–575.
- Leguizamón, E., & G. Ferrari. 2005. Relevamiento de las comunidades de malezas en sistemas de producción de soja bajo siembra directa. *Soja en siembra directa. Rev. Técnica AAPRESID*: 124–127.
- Leyser, O. 2009. The control of shoot branching: an example of plant information processing. *Plant, Cell & Environment* 32: 694-703
- Lorraine-Colwill, D., S. Powles, T. Hawkes, P. Hollinshead, S.A. Warner, & C. Preston. 2002. Investigations into the mechanism of glyphosate resistance in *Lolium rigidum*. *Pesticide Biochemistry and Physiology* 74(2): 62–72.
- Malpassi, R. 2004. Efecto de la aplicación de herbicidas sobre la morfología y anatomía de *Eleusine indica* (L.) Gaertner y *Portulaca oleracea* L.
- Mauricio, R. 2000. Natural selection and the joint evolution of tolerance and resistance as plant defenses. *Evolutionary Ecology* 14: 491-507.

- McAllister, R.S., & L.C. Haderlie. 1985. Translocation of ^{14}C -Glyphosate and $^{14}\text{CO}_2$ -labeled photoassimilates in Canada thistle (*Cirsium arvense*). *Weed science* v. 33:153-159.
- Mcwhorter, C.G., & C. Ouzts. 1994. Leaf Surface Morphology of *Erythroxyllum sp.* and Droplet Spread. *Weed science* 42(1): 18–26.
- Meusel, H. 1970. Wuchsformenriehen Mediterranean-mitteleuropäischer Angiosperm-Taxa. *Feddes Repert* 81: 41–59.
- Meusel, M.E., E. Jäger, & G. Mörchen. 1977. The study of growth-forms of higher plants in relation to application of biocide. *Vegetation Sci. and Environmental Protection*: 71–76.
- Monquero, P. 2003. Dinámica populacional e mecanismos de tolerancia de espécies de plantas daninhas ao herbicida glyphosate. Tesis Doctoral. ESALQ – USP. Piracicaba, Brasil.
- Monquero, P., P.J. Christoffoleti, J.A. Matas, & A. Heredia. 2004a. Caracterização da superfície foliar e das ceras epicuticulares em *Commelina benghalensis*, *Ipomoea grandifolia* e *Amaranthus hybridus*. *Planta Daninha* 22(2): 203–210.
- Monquero, P., P.J. Christoffoleti, M.D. Osuna, & R.A. De Prado. 2004b. Absorção, translocação e metabolismo do glyphosate por plantas tolerantes e suscetíveis a este herbicida. *Planta Daninha* 22(3): 445–451.
- Montenegro, G., & R. Ginocchio. 1992. Modular interpretation of architecture in shrub species. *An. Acad. Bras. Ci.* 65: 189 – 202.
- Moore, K.J., & L.E. Moser. 1995. Quantifying developmental morphology of perennial grasses. *Agronomy–Faculty Publications*: 81.
- Mühlberg, H. 1970. Wuchsformen der Gattung *Brachypodium* (Poaceae). *Feddes Repert* 81: 119–130.
- Norsworthy, J.K., N.R. Burgos, & L.R. Oliver. 2001. Differences in Weed Tolerance to Glyphosate Involve Different Mechanisms. *Weed Technology* 15(4): 725–731.
- Owen, M.D. 2008. Weed species shifts in glyphosate-resistant crops. *Pest Management Science* 64(4): 377–387.
- Panigo, E.; Ramos, J.; Lucero, L.; Perreta M. & A. Vegetti. 2011. The inflorescence in Commelinaceae. *Flora*. 206:294-299.
- Panigo, E.S., I.M. Dellaferrera, J.M. Acosta, A.G. Bender, J.I. Garetto, & M.G. Perreta. 2012. Glyphosate-induced structural variations in *Commelina erecta* L. (Comelinaceae). *Ecotoxicology and Environmental Safety* 76(0): 135–142.
- Papa, J.C., & L. Carrancio. 2005. Experiencias de control de ocucha. Para mejorar la producción. *INTA EEA Oliveros* 30: 153–154.

- Papa, J.C., & E. Puricelli. 2003. Control de *Parietaria debilis* con distintas dosis de herbicidas postemergentes. Revista de Investigaciones de la Facultad de Ciencias Agrarias IV. Available at <http://www.fcagr.unr.edu.ar/Investigacion/revista/rev4/4.htm> (verified 19 September 2007).
- Perez-Jones, A., K.-W. Park, N. Polge, J. Colquhoun, & C.A. Mallory-Smith. 2007. Investigating the mechanisms of glyphosate resistance in *Lolium multiflorum*. *Planta* 226(2): 395–404.
- Perreta, M.G. 2004. Caracterización de los patrones de desarrollo en *Melica* L. (Meliceae - POACEAE): análisis arquitectural.
- Perreta, M.G., & A.C. Vegetti. 2004. Estructura de las inflorescencias en especies de *Melica* (Meliceae, Pooideae, Poaceae). *Darwiniana* 42(1-4): 37–49.
- Perreta, M.G., & A.C. Vegetti. 2005. Structural patterns in vascular plants: a review. *Gayana Bot* 62: 9–19.
- Perreta, M; Ramos, J; Tivano J. C & A. Vegetti. 2011. Descriptive characters of growth form in Poaceae – an overview. *Flora*. 206:283-293.
- Procópio, S.O., E.A. Ferreira, E.A.M. Silva, A.A. Silva, & R.J.N. Rufino. 2003a. Estudos anatômicos de folhas de espécies de plantas daninhas de grande ocorrência no Brasil. V - *Leonurus sibiricus*, *Leonotis nepetaefolia*, *Plantago tomentosa* e *Sida glaziovii*. *Planta Daninha* 21: 403–411.
- Procópio, S.O., E.A. Ferreira, E.A.M. Silva, A.A. Silva, R.J.N. Rufino, & J.B. Santos. 2003b. Estudos anatômicos de folhas de espécies de plantas daninhas de grande ocorrência no Brasil: III-*Galinsoga parviflora*, *Crotalaria incana*, *Conyza bonariensis* e *Ipomoea cairica*. *Planta Daninha* 21: 1–9.
- Puricelli, E., & D. Faccini. 2005. Control de *Eustachys retusa* y *Chloris barbata* con glifosato. Soja en siembra directa. *Rev. Técnica AAPRESID*: 122–123.
- Puricelli, E., & D. Faccini. 2009. Efecto de la dosis de glifosato sobre la biomasa de malezas de barbecho al estado vegetativo y reproductivo. *Planta Daninha* 27: 303–307.
- Puricelli, E., & J.C. Papa. 2006. Growth of *Parietaria debilis* in fallow and in undisturbed areas. *Weed Research* 46: 129–137.
- R Development Core Team. 2010. A Language and Environment for Statistical. R Foundation for Statistical Computing. Vienna, Austria.
- Radosevich, S.R., J.S. Holt, & C.M. Ghersa. 2007. Ecology of Weeds and Invasive Plants: Relationship to Agriculture and Natural Resource Management.
- Rainero, H. 2004. Avances en el control de malezas con tolerancia al glifosato. *INTA-EEA Manfredi* 12: 5–12.

- Ricotta, J.A., & J.B. Masiunas. 1992. Relationship of leaf surface characteristics to acifluorfen tolerance in tomato (*Lycopersicon esculentum*) and related species. *Weed science* v. 40(3) p. 402-407 Available at <http://agris.fao.org/agris-search/search/display.do?f=1993/US/US93167.xml;US9312764> (verified 24 November 2012).
- Riederer, M., & L. Schreiber. 2001. Protecting Against Water Loss: Analysis of the Barrier Properties of Plant Cuticles. *J. Exp. Bot.* 52(363): 2023–2032.
- Ritz, C., N. Cedergreen, J.E. Jensen, & J.C. Streibig. 2006. Relative potency in nonsimilar dose–response curves. *Weed Science* 54(3): 407–412.
- Ritz, C., & J.C. Streibig. 2005. Bioassay analysis using R. *Journal of Statistical Software* 12(5): 1–22.
- Rodriguez, N. 2004. Malezas nuevas? o viejas que se adaptan a los nuevos sistemas. Malezas con grado de tolerancia al glifosato. *Bol. n° 1, INTA- EEA Manfredi* 12: 1–5.
- Rojano-Delgado, A.M., H. Cruz-Hipolito, R. De Prado, M.D. Luque de Castro, & A.R. Franco. 2012. Limited uptake, translocation and enhanced metabolic degradation contribute to glyphosate tolerance in *Mucuna pruriens* var. utilis plants. *Phytochemistry* 73: 34–41.
- Rua, G. H. & F. Weberling. 1995. Growth form and inflorescence structure of *Paspalum* L. (Poaceae, Paniceae): a comparative morphological approach. *B. eit. Biol. Pflanzen* 69: 363-431
- Sandberg, C.L., W.F. Meggitt, & D. Penner. 1980. Absorption, translocation and metabolism of ¹⁴C-glyphosate in several weed species. *Weed Research* 20(4): 195–200.
- Santier, S., & A. Chamel. 1998. Reassessment of the role of cuticular waxes in the transfer of organic molecules through plant cuticles. *Plant Physiology and Biochemistry* 36(3): 225–231.
- Satchivi, N.M., L.M. Wax, E.W. Stoller, & D.P. Briskin. 2000. Absorption and translocation of glyphosate isopropylamine and trimethylsulfonium salts in *Abutilon theophrasti* and *Setaria faberi*. *Weed Science* 48(6): 675–679.
- Schönbrunn, E., S. Eschenburg, W.A. Shuttleworth, J.V. Schloss, N. Amrhein, J.N.S. Evans, & W. Kabsch. 2001. Interaction of the herbicide glyphosate with its target enzyme 5-enolpyruvylshikimate 3-phosphate synthase in atomic detail. *PNAS* 98(4): 1376–1380.
- Scursoni, J.A., F. Forcella, & J. Gunsolus. 2007. Weed escapes and delayed weed emergence in glyphosate-resistant soybean. *Crop Protection* 26(3): 212–218.
- Scursoni, J.A., & E.H. Satorre. 2010. Glyphosate management strategies, weed diversity and soybean yield in Argentina. *Crop Protection* 29(9): 957–962.

- Seefeldt, S.S., J.E. Jensen, & E.P. Fuerst. 1995. Log-logistic analysis of herbicide dose-response relationships. *Weed Technology* 9(2): 218–227.
- Shaner, D.L. 2009. Role of Translocation as A Mechanism of Resistance to Glyphosate. *Weed Science* 57(1): 118–123.
- Sharma, S.D., & M. Singh. 2007. Effects of two surfactant series on the absorption and translocation of ¹⁴C-glyphosate in sicklepod and prickly sida. *Weed Biology and Management* 7(4): 219–225.
- Singh, B., & D. Shaner. 1998. Rapid Determination of Glyphosate Injury to Plants and Identification of Glyphosate-Resistant Plants. *Weed Technology* 12(3): 527–530.
- SøBye, K.W., J.C. Streibig, & N. Cedergreen. 2011. Prediction of joint herbicide action by biomass and chlorophyll a fluorescence. *Weed Research* 51(1): 23–32.
- Souza, R.T., E.D. Velini, & L.A. Palladini. 2007. Aspectos metodológicos para análise de depósitos de pulverizações pela determinação dos depósitos pontuais. *Planta Daninha* 25(1): 195–202.
- Steinrücken, H.C., & N. Amrhein. 1980. The herbicide glyphosate is a potent inhibitor of 5-enolpyruvyl-shikimic acid-3-phosphate synthase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 94(4): 1207–1212.
- Storkey, J. 2004. Modeling Seedling growth rates of 18 Temperate Arable Weeds Species as a Function of the Environment and Plant Traits. *Annals of Botany* 93: 681–689.
- Streibig, J.C. 1988. Herbicide bioassay. *Weed Research* 28(6): 479–484.
- Streibig, J.C., & P. Kudsk. 1993. Herbicide bioassays. CRC Press.
- Tardif, F.J., I. Rajcan, & M. Costea. 2006. A mutation in the herbicide target site acetohydroxyacid synthase produces morphological and structural alterations and reduces fitness in *Amaranthus powellii*. *New Phytol.* 169(2): 251–264.
- Tourn, G.M., D. Barthelemy, & J. Grosfeld. 1999. Una aproximación a la arquitectura vegetal: conceptos, objetivos y metodología. *Boletín de la Sociedad Argentina de Botánica* 34(1-2): 85–99.
- Traggiay, M., I. Dellaferrera, R. De Prado, & M.G. Perreta. 2009. Influencia de la edad de la planta y la temperatura de crecimiento de *Commelina erecta* sobre la cantidad y distribución de ceras epicuticulares y la tolerancia a glifosato. *In Resúmenes del XIX Congresso ALAM.* Lisbon, Portugal.
- Trejo, D., & M. Sobrero. 2012. Determinacion de la eficacia de glifosato para el control de *Petunia axillaris* (Lam.) Britton, Stern & Poggenb. *In actas do XXVIII CBCPD.* Campogrande, Brasil.

- Tuesca, D., & L. Nisensohn. 2004. Inhibidores de las síntesis de aminoácidos. *In* Herbicidas: Características y fundamentos de su actividad. Vitta, J. UNR Editora, Rosario.
- Tuffi Santos, L.D., R.M.S. Meira, I.C. Santos, & F.A. Ferreira. 2004. Efeito do glyphosate sobre a morfoanatomia das folhas e do caule de *Commelina diffusa* e *C. benghalensis*. *Planta Daninha* 22: 101–107.
- Tuffi Santos, L.D., B.F. Sant'Anna-Santos, R. Meira, F.A. Ferreira, R.A.S. Tiburcio, & A.F.L. Machado. 2009. Leaf anatomy and morphometry in three eucalypt clones treated with glyphosate. *Brazilian Journal of Biology* 69(1): 129–136.
- Vegetti, A. 1997. Sobre la estructura de la inflorescencia en especies de Anthistiriinae (Poaceae: Andropogoneae). (On the inflorescence structure in Anthistiriinae species (Poaceae: Andropogoneae). *Candollea* 52: 87–103.
- Velini, E.D., E. Alves, M.C. Godoy, D.K. Meschede, R.T. Souza, & S.O. Duke. 2008. Glyphosate applied at low doses can stimulate plant growth. *Pest Management Science* 64(4): 489–496.
- Velini, E.D., M.L.B. Trindade, L.R.M. Barberis, & S.O. Duke. 2010. Growth Regulation and Other Secondary Effects of Herbicides. *Weed Science* 58(3): 351–354.
- Vesk, P. & M. Westoby. 2004. Sprouting ability across diverse disturbances and vegetation types worldwide. *J. Ecol.* 92, 310–320.
- Vila-Aiub, M.M., P. Neve, & S.B. Powles. 2009. Fitness costs associated with evolved herbicide resistance alleles in plants. *New Phytologist* 184(4): 751–767.
- Vitta, J.I., D.E. Faccini, & L.A. Nisensohn. 2000. Control of *Amaranthus quitensis* in soybean crops in Argentina: an alternative to reduce herbicide use. *Crop Protection* 19(7): 511–513.
- Vitta, J., D. Tuesca, & E. Puricelli. 2004. Widespread use of glyphosate tolerant soybean and weed community richness in Argentina. *Agriculture, Ecosystems & Environment* 103(3): 621–624.
- Wakelin, A.M., D.F. Lorraine-Colwill, & C. Preston. 2004. Glyphosate resistance in four different populations of *Lolium rigidum* is associated with reduced translocation of glyphosate to meristematic zones. *Weed Research* 44(6): 453–459.
- Walker, E.R., & L.R. Oliver. 2008. Translocation and Absorption of Glyphosate in Flowering Sicklepod (*Senna obtusifolia*). *Weed Science* 56(3): 338–343.
- Wanamarta, G., & D. Penner. 1989. Foliar absorption of herbicides. *Rev. Weed Sci* 4: 215–231.
- Wang, C.J., & Z.Q. Liu. 2007. Foliar uptake of pesticides—Present status and future challenge. *Pesticide Biochemistry and Physiology* 87(1): 1–8.

- Webster, T.M., M.G. Burton, A.S. Culpepper, J.T. Flanders, T.L. Grey, & A.C. York. 2006. Tropical spiderwort (*Commelina benghalensis*) control and emergence patterns in preemergence herbicide systems. *J. Cotton Sci* 10: 68–75.
- Wen, M., C. Buschhaus, & R. Jetter. 2006. Nanotubules on plant surfaces: chemical composition of epicuticular wax crystals on needles of *Taxus baccata* L. *Phytochemistry* 67: 1808–1817.
- Westhoven, A.M., G.R. Kruger, C.K. Gerber, J.M. Stachler, M.M. Loux, & W.G. Johnson. 2008. Characterization of selected common lambsquarters (*Chenopodium album*) biotypes with tolerance to glyphosate. *Weed Science* 56(5): 685–691.
- WSSA Terminology Committee. 1998. Resistance and tolerance definitions. *Weed Technology* 12: 789.
- Xu, X., G.Q. Wang, S.L. Chen, C.Q. Fan, & B.H. Li. 2010. Confirmation of Flixweed (*Descurainia sophia*) Resistance to Tribenuron-Methyl Using Three Different Assay Methods. *Weed Science* 58(1): 56–60.

“...Una nuez es arrugada y viejita pero puede ofrecer mucha mucha mucha miel...”

Maria Elena Walsh