

**“Caracterización morfo-anatómica de dos poblaciones de
Gomphrena perennis L. y su posible relación con la
sensibilidad al herbicida glifosato”**

**Tesis presentada para optar al Título de Magister Scientiae de la
Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales.**

Universidad Nacional de La Plata

Alejandra Carbone



Director: Ing. Agr. José Beltrano

Co-director: Dr. Ing. Agr. Horacio Acciaresi

Evaluadores:

Dr. Ing. Agr. Eduardo Puricelli

Dr. Ing. Agr. Ricardo Sabbatini

Dr. Ing. Agr. Francisco Bedmar

24 de abril de 2015

Agradecimientos

Agradezco a la Universidad Nacional de La Plata y en especial a la Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales por haberme brindado la formación y el soporte económico para la realización de este trabajo. Al Instituto de Fisiología Vegetal (INFIVE-CONICET) donde pude llevar a cabo los ensayos experimentales que forman parte de este trabajo. A la Facultad de Ciencias Naturales y Museo, institución que me otorgó el título de grado y cuyos pasillos continué transitando todos estos años para recibir el aporte y ayuda desinteresada de investigadores y amigos que me brindaron sus conocimientos y ayuda de forma permanente.

Deseo agradecer a las siguientes personas que han sido un baluarte importante durante todo el transcurso de este trabajo:

- A mi director, Ing. Agr. José Beltrano, por sus aportes constantes de conocimientos, sugerencias e ideas que enriquecían las charlas y debates, agradeciendo muy profundamente su acompañamiento durante toda esta etapa.
- A mi codirector, Ing. Agr. Horacio Acciaresi, quien me brindó sus conocimientos y ayuda durante el desarrollo de este trabajo.
- A los Ing. Agr. Omar Pagani del INTA Banderas (Santiago del Estero) y Pablo Beluccini del INTA Marcos Juárez (Córdoba) por el envío del material vegetal con el cual se llevó a cabo este trabajo.
- A la Dra. Marta Ronco, por su ayuda y compañía incondicional y desinteresada.
- A las Dras. María Luján Luna, Gabriela Giúdice y Mariana Grossi por compartir sus conocimientos y experiencias en morfología vegetal y por brindarme su amistad.
- A mis compañeros de las cátedras de Fisiología Vegetal y Morfología Vegetal de la Facultad de Ciencias Agrarias, que me han brindado su compañerismo a diario.
- A Luciana Saldúa, quien me ha acompañado y brindado su apoyo durante toda esta etapa.

- A mis compañeros de trabajo del INFIVE, quienes me brindaron su compañerismo a diario, especialmente Mario Saparrat, María Silvia Tacaliti, Marcos Yannicari, Cecilia Arango, Marcela Ruscitti, Daniel Giménez y Laura Wahnan.

Al Ing. Agr. Ricardo Moschini por aportar los datos climáticos de las localidades evaluadas en este trabajo.

A los señores evaluadores, quienes han aportado sus conocimientos y enriquecido los contenidos de la tesis.

- A mi familia, especialmente mi hija Julia y mis padres, que han sido el ejemplo y estímulo más importante para encarar la vida con optimismo a pesar de las dificultades.

INDICE GENERAL

CAPÍTULO 1. INTRODUCCION	1
1. Malezas	1
1.1. Características y adaptabilidad	1
1.2. Manejo de las malezas y cultivos resistentes a herbicidas en la República Argentina	2
1.3. Glifosato	4
2. Resistencia y tolerancia de las malezas a los herbicidas	7
2.1. Resistencia	7
2.1.1. Mecanismos involucrados en la resistencia a los herbicidas	8
2.2. Tolerancia a los herbicidas	9
2.2.1. Características morfológicas que confieren tolerancia a los herbicidas	11
2.2.2. Características fisiológicas que confieren tolerancia a los herbicidas	13
3. <i>Gomphrena perennis</i> L. “siempre viva del campo”	14
3.1. Características generales y distribución geográfica	14
3.2 Comportamiento ecológico de <i>Gomphrena</i> en sistemas productivos	16
Hipótesis	18
Objetivo general	18
Objetivo particular	19
CAPÍTULO 2. MATERIALES Y METODOS	20
2.1. ESTUDIOS MORFOANÁTOMICOS DE HOJAS ADULTAS	20
2.1.1. Superficie foliar	20
2.1.2. Anatomía	21

2.2. ANALISIS FISIOLÓGICO DE LA RESPUESTA A DIFERENTES DOSIS DE GLIFOSATO	22
2.2.1. Aplicación del glifosato	23
2.2.2. Determinaciones fisiológicas	24
2.2.2.1. Evaluación de la acumulación de ácido shikímico (AS) en raíces (R), hojas basales (HB) y hojas apicales (HA)	24
2.2.2.2. Evaluación del índice de verdor (IV).	24
2.2.2.3. Intercambio Neto de Carbono (INC).	25
2.2.2.4. Supervivencia al herbicida.	25
CAPÍTULO 3. RESULTADOS	27
3.1. RESULTADOS ESTUDIO MORFO-ANATÓMICO DE HOJAS ADULTAS	27
3.1.1. Venación	27
3.1.2. Superficie foliar	27
3.1.2.1. Características de las células epidérmicas, tricomas y estomas	27
-Forma de las células epidérmicas	27
-Tricomas	27
-Estomas	29
-Ornamentación de la cutícula	29
3.1.2.2. Morfología de las ceras epicuticulares	29
3.1.3. Anatomía	30
3.2. ANALISIS FISIOLÓGICO DE LA RESPUESTA A DIFERENTES DOSIS DE GLIFOSATO	31
3.2.1. Acumulación de Acido Shikímico (AS)	31
3.2.1.1. Contenido de AS acumulado en Raíz (R)	35

3.2.1.2. Contenido de AS en Hojas Basales (HB)	37
3.2.1.3. Contenido de AS en Hojas Apicales (HA)	38
3.2.2. Índice de Verdor (IV) mediante el uso del SPAD Minolta	41
3.3. Determinación de parámetros metabólicos	42
3.3.1. Fotosíntesis Neta (PN)	42
3.3.2. Transpiración (E)	44
3.3.3. Conductancia Estomática (Sc)	46
3.4. Supervivencia de plántulas (SP)	47
3.4.1. SP provenientes de Córdoba	49
3.4.2. SP provenientes de Santiago del Estero	49
3.5. Determinación de peso seco (PS) a los 30 días PA del herbicida	50
3.5.1. Peso seco aéreo (PSA)	50
3.5.2. Peso seco radicular (PSR)	53
3.5.3. Peso seco en las yemas activas ubicadas en el cuello de las plantas (PSY)	55
CAPÍTULO 4. DISCUSIÓN	56
4.1.1. Estudio morfo-anatómico de las hojas	56
4.1.2. Anatomía de la lámina foliar	59
4.2. Efecto de la aplicación de glifosato sobre la fisiología de <i>Gomphrena perennis</i>	60
4.2.1. Acumulación de Acido Shikímico (AS)	62
4.2.2. Índice de Verdor (IV)	63
4.2.3. Determinación de parámetros metabólicos	65
Fotosíntesis Neta (PN)	65
Transpiración (E)	66
Conductancia Estomática (Sc)	68
4.2.4. Supervivencia de plántulas (SP)	68
4.2.5. Peso seco (PS)	70
4.2.5.1. Peso seco aéreo (PSA)	70

4.2.5.2. Peso seco radicular (PSR)	71
4.3.5.3. Peso seco de las yemas activas ubicadas en el cuello de las plantas (PSY)	72
CAPITULO 5. CONCLUSIONES	74
CAPITULO 6. BIBLIOGRAFIA	76
ANEXO I	92
Lámina 1. Estructura de la hoja de <i>G. perennis</i> en vista superficial	92
Lámina 2. Detalle de los caracteres epidérmicos de la hoja de <i>G. perennis</i> posiblemente relacionados a la tolerancia al herbicida.	94
Lámina 3. Estructura de la hoja de <i>G. perennis</i> en sección transversal.	96
Lámina 4. Material vegetal procedente de Marcos Juárez (Córdoba). Efectos de la aplicación del glifosato.	98
Lámina 5. Material vegetal procedente de Banderas (Santiago del Estero). Efectos de la aplicación del glifosato	100
ANEXO II.	102
Tabla 1. Datos climáticos Los Hornos (partido de La Plata)	102
Tabla 2. Datos climáticos invernáculo (INFIVE, partido de La Plata)	103
Tabla 3. Datos climáticos Marcos Juárez (provincia de Córdoba)	104
Tabla 4. Datos climáticos Banderas (provincia de Santiago del Estero)	105

INDICE DE CUADROS

Tabla 1. Longitud y número de tricomas en hojas de <i>G. perennis</i> procedentes de Córdoba y Santiago del Estero.	28
Tabla 2. Número de estomas presentes por mm ² en hojas de <i>G. perennis</i> procedentes de Córdoba y Santiago del Estero.	29
Tabla 3. Valor de probabilidad (P) obtenido a partir del análisis de medias (ANOVA) del efecto ejercido por el Ambiente donde crecieron las plantas sobre el contenido de ácido shikímico (AS).	32
Tabla 4. Valores de probabilidad (P) obtenidos a partir de los correspondientes análisis de medias (ANOVA) del contenido de AS según el efecto de la Población (Pobl), Dosis de glifosato (Dosis), Horas Post-aplicación (HPA), Organo vegetal (Órgano) y las interacciones resultantes.	34
Tabla 5. Valores de probabilidad (P) obtenidos a partir de los correspondientes análisis de medias (ANOVA) del contenido de AS en R, según el efecto de la Población (Pobl), Dosis de glifosato (Dosis), Horas Post-aplicación (HPA) y las interacciones resultantes	36
Tabla 6. Valores de probabilidad (P) obtenidos a partir de los correspondientes análisis de medias (ANOVA) del contenido de AS en HB, según el Efecto de la Población (Pobl), Dosis de glifosato (Dosis), Horas Post-aplicación (HPA) y las interacciones resultantes.	37
Tabla 7. Valores de probabilidad (P) obtenidos a partir de los correspondientes análisis de medias (ANOVA) del contenido de AS en HA, según el Efecto de la Población (Pobl), Dosis de glifosato (Dosis), Horas Post-aplicación (HPA) y las interacciones resultantes.	39
Tabla 8 Valores de probabilidad (P) y R ² obtenidos del análisis de regresión del Índice de Verdor (IV) según la Población (C y SE) y Lugar de crecimiento (intem. e inv.) a los 10 Días Post-aplicación (DPA) de glifosato.	41
Tabla 9. Valores de probabilidad (P) obtenidos a partir de los correspondientes análisis de medias (ANOVA) sobre la Fotosíntesis neta (PN) según el efecto de la Población (Pobl.), ambiente de crecimiento (Ambiente), dosis de glifosato (Dosis) y las interacciones resultantes.	43

- Tabla 10. Valores de probabilidad (P) obtenidos a partir de los correspondientes análisis de medias (ANOVA) sobre la Transpiración (E) según el efecto de la Población (Pobl), ambiente de crecimiento (Ambiente), dosis de glifosato (Dosis) y las interacciones resultantes. 45
- Tabla 11. Valores de probabilidad (P) obtenidos a partir de los correspondientes análisis de medias (ANOVA) sobre la Conductancia Estomática (CS) según el efecto de la Población (Pobl.), ambiente de crecimiento (Ambiente), Dosis de glifosato (Dosis) y las interacciones resultantes 47
- Tabla 12. Valores de probabilidad (P) y R^2 obtenidos del análisis de regresión de la Supervivencia de Plántulas (SP) según la Población (C y SE) y Lugar de crecimiento (ítem. e inv.) a los 15 Días Post-aplicación (DPA) de glifosato 48
- Tabla 13. Valores de probabilidad (P) obtenidos a partir de los correspondientes análisis de medias (ANOVA) sobre el Peso seco aéreo (PSA) según el efecto de la Población (Pobl), Ambiente de crecimiento (ambiente), Dosis de glifosato (Dosis) y las interacciones resultantes 52
- Tabla 14. Valores de probabilidad (P) obtenidos a partir de los correspondientes análisis de medias (ANOVA) sobre el Peso seco radicular (PSR) según el efecto de la Población (Pobl), Ambiente de crecimiento (ambiente), Dosis de glifosato (Dosis) y las interacciones resultantes. 54

INDICE DE FIGURAS

Gráfico 1. Contenido de Acido Shikímico (AS) expresado en μggPF^{-1} acumulado en plantas provenientes de Córdoba y Santiago del Estero.	31
Gráfico 2. Contenido de Acido Shikímico (AS) expresado en μggPF^{-1} a las 24, 48 y 72 horas post-aplicación (HPA) del herbicida.	32
Gráfico 3. Contenido de Acido Shikímico (AS) expresado en μggPF^{-1} según las diferentes dosis de glifosato.	33
Gráfico 4. Contenido de Acido Shikímico (AS) expresado en μggPF^{-1} en Raíz (R), Hoja basal (HB) y hoja apical (HA).	34
Gráfico 5. Contenido de Acido Shikímico (AS) expresado en μggPF^{-1} acumulado en Raíz (R) en plantas provenientes de Córdoba (A) y Santiago del Estero (B).	36
Gráfico 6. Contenido de Acido Shikímico (AS) expresado en μggPF^{-1} en Hojas Basales (HB) en plantas provenientes de Córdoba (A) y Santiago del Estero (B)	38
Gráfico 7. Contenido de Acido Shikímico (AS) expresado en $\mu\text{g.gPF}^{-1}$ en Hojas Apicales (HA) en plantas provenientes de Córdoba (A) y Santiago del Estero (B)	40
Gráfico 8. Dosis de inhibición media (I50) (expresado en unidades Spad) en plantas provenientes de Córdoba y Santiago del Estero cultivadas en invernáculo e intemperie a los 10 DPA.	41
Gráfico 9. Fotosíntesis Neta (PN) expresado en $\mu\text{mol CO}_2\text{m}^{-2}\text{seg}^{-1}$ en plantas provenientes de Córdoba y Santiago del Estero cultivadas en invernáculo e intemperie (A y B respectivamente).	42
Gráfico 10. Transpiración (E) expresado en $\text{mmol H}_2\text{Om}^{-2}\text{seg}^{-1}$ en plantas provenientes de Córdoba cultivadas en invernáculo e intemperie (A) y de Santiago del Estero cultivadas en invernáculo e intemperie (B).	44
Gráfico 11. Conductancia Estomática (SC) expresado en $\text{mmol H}_2\text{Om}^{-2}\text{seg}^{-1}$ en plantas provenientes de Córdoba cultivadas en invernáculo e intemperie (A) y de Santiago del Estero cultivadas en invernáculo e intemperie (B)	46

Gráfico 12. Dosis de inhibición media (I50) de Supervivencia (%PS) de plantas de Córdoba y Santiago del Estero cultivadas en invernáculo e intemperie a los 15 DPA del glifosato 48

Gráfico 13. Peso seco aéreo (PSA) en plantas de Córdoba cultivadas en invernáculo e intemperie (A) y de Santiago del Estero cultivadas en invernáculo e intemperie (B). 50

Gráfico 14. Peso seco radicular (PSR) en plantas de Córdoba cultivadas en invernáculo e intemperie (A) y de Santiago del Estero cultivadas en invernáculo e intemperie (B). 53

Gráfico 15. Peso seco de yemas activas (PSY) en plantas de Córdoba cultivadas en invernáculo e intemperie (A) y de Santiago del Estero cultivadas en invernáculo e intemperie (B). 55

ABREVIATURAS

AS: Acido shikímico

CRH: cultivo resistente a herbicida

DCA: diseño completamente aleatorizado

DDA: días desde aplicación

DPA: días post aplicación

DR: dosis recomendada

E: transpiración

EPSPS: enzima 5-enolpiruvil shikimato 3-fosfato sintetasa

FAA: formaldehído, ácido acético, etanol

g e.a: gramo equivalente ácido

HA: hojas apicales

HB: hojas basales

HPA: horas post-aplicación

INC: intercambio neto de carbono

INFIVE: Instituto de Fisiología Vegetal

IV: índice de verdor

lpc: litros producto comercial

MEB: microscopía electrónica de barrido

MO: microscopía óptica

PEP: fosfoenol piruvato

PN: fotosíntesis neta

PS: peso seco

PSA: peso seco aéreo

PSR: peso seco radicular

PSY: peso seco yemas activas

R: raíz

RR: soja resistente a Roundup

Sc: conductancia estomática

SD: siembra directa

SP: supervivencia de plántulas

T0: plantas control sin aplicación de glifosato

T4: plantas aplicadas con la dosis recomendada

RESUMEN

Gomphrena perennis es una maleza con metabolismo C4 y presencia de un sistema radicular con yemas capaces de rebrotar, lo que dificulta la siembra de cultivos estivales. Amplias zonas productivas de Argentina registran infestación con *G. perennis* tolerantes a glifosato. Los objetivos de la tesis fueron caracterizar morfo-anatómicamente las hojas de *G.* provenientes de lotes de Banderas, Santiago del Estero (Lat.28°28'00"S; Long.62°06'00"W) y de Marcos Juárez, Córdoba (Lat.32°41'00"S; Long.62°09'00"W), dos de las áreas donde la maleza constituye una importante problemática para el productor agrícola. Además, determinar si las estructuras presentes en la epidermis podrían comportarse como barreras mecánicas para la absorción y posterior traslado del herbicida, cuantificadas por la acumulación de ácido shikímico (AS) y otros parámetros metabólicos. Semillas de ambas procedencias se sembraron y se cultivaron en invernadero (INFIVE) y en intemperie. Cuando las plantas alcanzaron 4 hojas expandidas se aplicaron diferentes dosis de glifosato (0; 180; 360; 720, 1440, 2880 y 5760 g.e.ácido/Ha) Se evaluó contenido de AS en raíces (R), hojas basales (HB) y hojas apicales (HA). A los 7 días post-aplicación (DPA) se midió la fotosíntesis neta (PN), transpiración (E) y conductancia estomática (CS) en plantas control (T) y tratadas con la dosis recomendada (DR:1440 g.e.a/Ha). Se registró la supervivencia (S) a los 15 y 30DPA. El diseño fue aleatorizado con tres repeticiones y los datos fueron analizados por medio de la prueba de Anova ($p < 0,05$ y $p < 0,01$). Las dos poblaciones fueron tolerantes a glifosato, si bien la de Banderas manifestó una mayor sensibilidad a la DR del herbicida respecto a la de Córdoba. *G. perennis* posee baja área foliar, con ceras epicuticulares, y abundantes tricomas, los cuales se comportarían como barreras físicas reduciendo la eficacia del glifosato, lo que explicaría la tolerancia al herbicida. Banderas mostró mayor densidad de tricomas por unidad de superficie que la de Córdoba, si bien éstas últimas tuvieron mayor cantidad de drusas. La mayor susceptibilidad a la DR en Banderas se manifestó por presentar clorosis y necrosis en hojas apicales a partir de 2DPA, mientras que Córdoba manifestó esos síntomas con menor severidad y luego de 7 DPA. En ambas poblaciones se observó ruptura de dominancia apical cuando se aplicó la DR del herbicida y superiores. Esta respuesta indujo la actividad de yemas basales del xilopodio, causando rebrote y desarrollo de nuevas ramificaciones aéreas. Estas modificaciones por efecto del herbicida serían causadas por la alteración en el modelo del traslado de asimilados,

cambiando los destinos hacia los órganos subterráneos. Siete DPA de la DR del herbicida se observó reducción en la PN, E y CS en ambas poblaciones. Dicha disminución fue más acentuada en Banderas evidenciando mayor sensibilidad a la aplicación del herbicida. Éstos resultados indican que el glifosato afecta los parámetros metabólicos en plantas susceptibles, si bien la DR no resulta efectiva debido al rebrote de las yemas axilares del xilopodio observado a los 15DPA. El conocimiento de la morfología y ecofisiología de esta especie, como así también la dinámica de la germinación y crecimiento de las plántulas proporcionarían las pautas necesarias para tomar las decisiones técnicas para un manejo adecuado de control.

ABSTRACT

Gomphrena perennis is a weed with C4 metabolism, with a root system that is able to resprout, all characteristics that turn this plant problematic to control, especially during summer cropping. Large productive areas of Argentina have been recording infestations with glyphosate-tolerant *G. perennis*. The aim of the thesis were to characterize morpho-anatomically leaves of *G. perennis* coming from Banderas, Santiago del Estero (Lat.28°28'00"S; Long.62°06'00"W) and Marcos Juárez, Córdoba (Lat.32°41'00"S; Long.62°09'00"W) – both important extensive agricultural areas in this country - and determine whether structures present in the epidermis could behave as mechanical barriers to uptake and subsequent herbicide transport, quantified by the accumulation of shikimic acid (AS) and others metabolic parameters. Seeds of both origin were sown and cultivated in greenhouse (INFIVE) and open-field conditions. When plants reached 4 expanded leaves, different doses of glyphosate were applied (0; 180; 360; 720, 1440, 2880 and 5760 g.e.a/Ma). The content of AS was evaluated in roots (R), basal leaves (HB) and apical leaves (HA). Seven days after application (DPA) was determined photosynthesis net (PN), transpiration (E) and stomatal conductance (CS), in control plants (T) and in treated with the recommended dose (DR:1440 g.e.a/Ha). The survival (S) was recorded at 15 and 30DPA. The experimental design was randomized with three replicates, and the data were analyzed by means of Anova Test ($p < 0.05$ and $p > 0.01$). The two populations were tolerant to glyphosate. Banderas showed a greater sensitivity to the DR of the herbicide when compared to that of Cordoba. *G. perennis* had low leaf area, wax epicuticulars, and more abundant trichomes. These characters reduce the effectiveness of

glyphosate, since they act as physical barriers, which would explain the tolerance to the herbicide. Banderas had higher density of trichomes per unit area than that of Cordoba, meanwhile the latter had more drusen. The greater susceptibility of glyphosate DR on Banderas population was expressed by chlorosis and necrosis in apical leaves at 2DPA, meanwhile Cordoba expressed those symptoms with less severity, and after 7 DPA. Both populations showed rupture of apical dominance at DR and higher doses. This response induced the activity of xilopodio basal buds, initiating the re-growth and emergence of new aerial branches. From these results, it can be presumed that this process would be caused by the alteration in the distribution of assimilates by the herbicide application what modified the distribution to the underground organs. Seven DPA after DR application it was observed reduction in PN, E and CS in both populations. This decrease was more evident in Banderas population, showing again a higher sensitivity of these plants to glyphosate by affecting metabolic parameters in susceptible plants. The DR was found not effective to control *G. perennis* because of the sprouting of axillary buds of the xilopodio observed at 15DPA. The knowledge of the morphology and ecophysiology of this species, as well as germination dynamics and seedling growth would provide the necessary tools to take technical decisions for an adequate management control.

CAPÍTULO 1

INTRODUCCION

1. Malezas.

1.1. Características y adaptabilidad.

Se denomina maleza “a cada una de las especies que invaden los cultivos y son difíciles de extirpar”, aunque es necesario ampliar y hacer referencia que “se trata de plantas que llegan a ser perjudiciales o indeseables en determinado lugar y en cierto tiempo” (Marzocca et al., 1976).

Labrada y Parker (1996) consideran malezas a aquellas plantas que interfieren con la actividad humana en áreas cultivables y no cultivables. Los efectos que ejercen sobre los cultivos pueden ser directos o indirectos: entre los primeros se destacan las pérdidas a causa de la disminución del rendimiento por la competencia por recursos limitantes o la depreciación comercial del producto debido a la presencia de impurezas. Entre los efectos indirectos de las malezas sobre el cultivo, se destaca la necesidad de efectuar labores adicionales incrementando los costos, actuar como reservorio de enfermedades y ser una futura fuente de inóculo o restringir los posibles cultivos a realizar en un determinado lote debido a las limitadas herramientas de control de la vegetación espontánea.

Según Leguizamón (2008) “Las malezas son una forma especial de vegetación altamente exitosa en ambientes agrícolas: son poblaciones vegetales que crecen en ambientes perturbados por el hombre sin haber sido sembradas”. Desde un punto de vista ecológico las malezas pueden ubicarse dentro de las pioneras de la sucesión secundaria. En el agroecosistema el impacto crítico de las malezas es el efecto negativo sobre las plantas cultivadas ejercido a través de la interferencia, donde se resume la interacción competitiva y la alelopatía.

Comúnmente, las especies que se comportan como malezas resisten mejor que las plantas cultivadas ciertos factores adversos, tales como los climáticos, edáficos e incluso los de orden biológico. Frecuentemente, son más resistentes a determinados agentes patógenos que las plantas cultivadas e incluso, inmunes a ellos (Baker 1974).

Las malezas presentan características adaptativas que determinan la elevada competitividad con los cultivos. Entre ellas puede mencionarse, la elevada tasa de crecimiento en estadios iniciales de plántula (Grime, 1979); altas tasas de fijación de CO₂ (Black et al. 1969); rápido crecimiento y desarrollo del sistema radicular, elevada tasa de partición de fotoasimilados hacia las zonas de activo crecimiento y la generación de estructuras reproductivas en cortos períodos de tiempo (Potter y Jones, 1977).

Además, las malezas presentan atributos resultantes de la adaptación a prácticas agrícolas que les da trascendencia agroecológica, entre estos: similitud morfológica y fisiológica a los cultivos, abundante producción de semillas con diferentes mecanismos de dormición, propagación vegetativa y tolerancia o resistencia a herbicidas, entre otros (Ríos, 2005). Muchas malezas poseen órganos vegetativos de propagación, tales como rizomas, estolones, bulbos, etc. que les permite invadir los campos con rapidez; las plantas son más vigorosas que las cultivadas, desplazándolas pues compiten por la luz, agua, espacio y nutrientes. Las semillas maduras de las malezas, caen antes o maduran al mismo tiempo que las del cultivo y normalmente son muy difíciles de separar en las trilladoras comunes. Algunas semillas cuentan con órganos de diseminación muy especializados que aseguran su dispersión. Cuando así ocurre, el número de semillas que producen es tan elevado que la descendencia queda asegurada, en otros casos tienen la capacidad de conservar su poder germinativo durante muchos años (Zimdahl, 1993).

1.2. Manejo de las malezas y cultivos resistentes a herbicidas en la República Argentina.

En Argentina, en los años 90 comenzó una fuerte expansión de la siembra directa (SD), impulsada por la baja de precio del herbicida glifosato y la aparición de variedades de soja resistentes a dicho herbicida (Soja RR). Esta situación fue aprovechada por muchos

productores y empresarios para rediseñar la estructura productiva de sus establecimientos y empresas (Ekboir, 2001; Satorre, 2005).

Una estructura característica de estas nuevas organizaciones productivas fueron los llamados “pooles de siembra”, empresas que captan fondos y aprovechan la gran capacidad de trabajo que permite la SD con soja RR y la disponibilidad de campos en alquiler a precios accesibles. La asociación de estos factores produjo incrementos de las áreas de siembra ampliándose las fronteras agrícolas y restringiendo la ganadería a zonas marginales (Piñero, M. 2003).

La difusión de sistemas de SD ha provocado modificaciones en la composición de la flora ligada a la utilización de herbicidas asociados a la labranza cero (Puricelli y Tunesca, 1997). La Cámara de Sanidad Agropecuaria y Fertilizantes (CASAFE) indica que el glifosato está indicado para el control de malezas presentes en el rastreo del cultivo antecesor al que va a sembrarse utilizando la técnica de SD (CASAFE 2007). Pengue (2003), informó que el 37% del total de los principios activos empleados en el control de malezas está representado por glifosato, con una tendencia creciente en su utilización.

Rainero (2008) indica que en amplias regiones de Argentina, durante los últimos años, se han producido cambios importantes en las poblaciones de malezas en los diferentes sistemas de producción. Las principales causas responsables serían la extensa superficie sembrada con soja RR, la gran difusión de la SD, el uso masivo de glifosato, el desinterés por la rotación de cultivos, la escasa diversidad de productos químicos aplicados, la ocupación de tierras menos aptas para la agricultura y el intenso desmonte.

Esto generó una nueva problemática, como es la difusión de malezas con tolerancia a glifosato. No obstante, esta situación no es una consecuencia directa del glifosato, sino de su uso indiscriminado (Rainero, 2008).

La introducción y la adopción de nuevas alternativas de manejo a menudo resultan en cambios en las especies que caracterizan a las distintas poblaciones de malezas (Culpepper, 2006).

El uso continuo de glifosato puede conducir a la selección de poblaciones de malezas resistentes a este herbicida. Sin embargo, los cambios en la composición de las malezas

susceptibles a más tolerantes sucede más rápidamente que la selección de genes de resistencia (Shaner, 2000).

La utilización continua de herbicidas de acción fisiológica similar, predispone a una desfavorable selección interespecífica de malezas (Hakansson, 2003). En tal caso, Ríos (2005) advierte la predominancia de gramíneas en lotes trabajados bajo sistemas sin laboreo. Sin embargo, son las repercusiones de la selección intra-específica las de mayor relevancia pues conllevan el aumento en la frecuencia de genotipos resistentes al herbicida aplicado (Hakansson, 2003). Esta cuestión ha sido la responsable de la aparición de poblaciones resistentes a los principios activos de mayor uso (Le Baron y Gressel, 1982; Powles y Holtum, 1994; Espinoza et. al., 2005).

La utilización masiva e ininterrumpida de estos materiales modificados genéticamente trajo aparejado que el glifosato se constituya en la alternativa preponderante de control de malezas durante el ciclo del cultivo (Pengue, 2003). Así, la amplia adopción de los cultivos resistentes a herbicidas (CRH) y el subsecuente uso de glifosato, en las distintas zonas agrícolas, ha significado una importante presión de selección para las malezas que son controladas por este herbicida. De este modo, a pesar de la continua utilización de esta tecnología en los últimos 10 años, no fue posible erradicar a las malezas, por el contrario, se han verificado importantes cambios en las especies que integran las comunidades de malezas. Por otra parte, asociado con un uso inapropiado de esta tecnología, se ha detectado un incremento en el número y densidad de biotipos o de especies que logran sobrevivir a los tratamientos con glifosato (Webster y Sosnoskie, 2010).

1.3. Glifosato.

El glifosato es un herbicida de amplio espectro que se absorbe a través del follaje y se traslada por tallos y raíces por vía floemática (Sprankle et. al., 1975). Cuando el glifosato se deposita sobre la superficie foliar se inicia el proceso de absorción que, primero, debe atravesar una capa de cera epicuticular de características variables según la especie y condiciones de crecimiento. Posteriormente, debe pasar a través de la cutícula, que se

encuentra interrumpida por ectodesmos que constituyen vías de penetración del herbicida a la hoja. Cuando el glifosato es formulado como sal de isopropilamina la absorción es más eficiente que formulado como ácido. Finalmente, el herbicida atraviesa la laminilla media, la pared celular y la membrana plasmática para ingresar a las células epidérmicas. El transporte a través de la plasmalema podría verse favorecido por la actividad de transportadores de fosfato (Herbicide Handbook, 1994).

El mecanismo por el cual el glifosato ingresa a la célula aún está en discusión, pero existen evidencias que hacen suponer que están involucrados fosfato-transportadores y un sistema pasivo de flujo masal (Shaner 2009). Roso y Vidal (2010) indicaron que los fosfato-transportadores pueden tener un rol importante en el movimiento de glifosato a través de las membranas. Por lo tanto, cualquier efecto negativo del glifosato sobre los fosfato-transportadores podrían condicionar indirectamente el transporte de asimilados hacia los destinos en activo crecimiento. La alteración funcional de dichas proteínas transportadoras afectan el crecimiento y división celular y éste proceso está directamente relacionado a la demanda de asimilados.

Principalmente, la traslocación del herbicida es por vía simplástica conllevando a la acumulación del producto en órganos subterráneos, hojas jóvenes y meristemas. Los resultados de estudios respecto al traslado apoplástico, sugieren un bajo transporte relativo por esta vía (Herbicide Handbook, 1994).

Numerosos trabajos encontraron correlaciones positivas entre el transporte (o translocación) de glifosato y el de fotoasimilados desde los órganos fuente a los destinos (Gougler y Geiger, 1981) indicando que el transporte del herbicida podría condicionar al metabolismo de fotoasimilados, e inducir efectos de auto-limitación del traslado del herbicida en la planta. Se postularon varios factores como los responsables del proceso de auto-limitación en la movilidad del glifosato.

Según Geiger y Bestman (1990), el glifosato limita su transporte vía floema por alguna de las siguientes alternativas: a) inhibir la fijación de CO₂ lo cual limita la disponibilidad de asimilados; b) detener la síntesis del almidón y alterar la regulación del metabolismo del carbono entre las rutas de biosíntesis del almidón y de ácido shikímico (AS) en los cloroplastos, lo que limitaría la cantidad de carbono asimilado disponible para la

exportación durante la noche o en momentos de baja fotosíntesis; c) limitar el uso de las reservas de almidón para mantener la exportación de sacarosa a la noche y durante períodos de baja tasa de fotosíntesis; d) dañar la integridad de los tejidos vasculares involucrados en la conducción de asimilados; e) reducir el flujo de sacarosa inhibiendo la descarga del mismo y f) inhibir la síntesis de proteínas en los tejidos que están en activo crecimiento.

El transporte sistémico del glifosato depende directamente de la producción de sacarosa en los órganos fuente donde los fotoasimilados son cargados al floema (Devine y Hall, 1990). Yannicari (2014) trabajando con biotipos susceptibles a glifosato de *Lolium perenne* informó la auto-limitación del transporte del herbicida causado por la inhibición en el movimiento de asimilados en los órganos fuente.

El glifosato es un herbicida inhibidor de la síntesis de aminoácidos, a través de la inhibición de la enzima EPSPS (5-enolpiruvil shikimato 3-fosfato sintetasa). La EPSPS es codificada por el núcleo celular y transportada al cloroplasto a través de un péptido de transporte, y es en el cloroplasto donde participa de la ruta metabólica del ácido shikímico. El sitio de acción del herbicida es la enzima 5-enolpiruvilshikimato-3-fosfato sintetasa (EPSPs) responsable de catalizar la reacción entre el shikimato-3-fosfato y el fosfoenolpiruvato (PEP), generando un producto precursor de aminoácidos aromáticos (triptófano, tirosina y fenilalanina) (Amrhein et. al., 1980). El efecto del glifosato en el metabolismo de la planta se traduce en la acumulación de ácido shikímico (Pline et. al., 2002b) y la inhibición de la acción de la enzima blanco por competir con el PEP por el sitio de unión a la EPSPs (Schönbrunn et. al., 2002). Como resultado de las alteraciones provocadas por el herbicida se afecta la biosíntesis de triptófano, tirosina y fenilalanina, el metabolismo proteico y en la síntesis de metabolitos aromáticos secundarios: lignina, flavonoides, alcaloides (Herrmann, 1995 y Franz et. al., 1997) y hormonas vegetales (Pérez Jones et al., 2007).

La función de la enzima EPSP es unir el ácido shikímico con ácido fosfoenolpirúvico (PEP) para formar EPSPS. Como la estructura de PEP y del glifosato son muy similares, el glifosato actúa como inhibidor competitivo y se une fuertemente al complejo formado por el shikimato y la EPSPS, resultando una acumulación de shikimato. El glifosato se transporta de manera simplástica hacia los puntos de crecimiento de la planta y, al actuar

como inhibidor competitivo de la EPSPS, el resultado es la acumulación shikimato y el bloqueo de la síntesis de los aminoácidos aromáticos (Pline et al., 2002b). En consecuencia, la presencia del glifosato determina acumulación de ácido shikímico y afecta varios procesos fisiológicos (Cole, 1985).

Numerosos estudios indican que la determinación de AS podría ser un indicador de la susceptibilidad de la planta al glifosato (Zelaya et al.; 2004; Shaner et al.; 2005; Henry et al.; 2007) y diversos autores demostraron que la acumulación de AS es diferencial entre poblaciones de distinta sensibilidad al glifosato (Yu et al.; 2009; Yanniccari et al., 2009; 2014).

2. Resistencia y tolerancia de las malezas a los herbicidas

2.1. Resistencia

Se ha definido la resistencia a herbicidas como la habilidad o capacidad inherente de una planta a sobrevivir y reproducirse exitosamente luego de exponerla a dosis normalmente letales del herbicida (Herbicide Resistant Plants Committe, 1998; Puricelli et al., 2005). En tanto que la planta en cuestión, puede haber adquirido la resistencia naturalmente, por técnicas de ingeniería genética, por selección de variantes salvajes producidas por prácticas culturales o mutagénesis.

El primer episodio de resistencia a herbicidas registrado en malezas fue para 2,4 D, pero recién hacia 1970 fue publicado el primer caso de resistencia a triazina en *Senecio vulgaris*. En las últimas décadas se han presentado varios casos más y en la actualidad, hay registrados 321 biotipos resistentes, de los cuales 115 pertenecen a las dicotiledóneas y 82 a monocotiledóneas en unos 50 países de todo el mundo (Heap, 2011).

El glifosato se introdujo en el mercado en 1974, y el primer caso de resistencia se registró luego de 22 años de su lanzamiento, estableciéndose dentro de los herbicidas menos propensos al desarrollo de resistencia. Actualmente, a nivel mundial, 15 especies han sido destacadas por presentar biotipos capaces de sobrevivir y reproducirse luego de aplicar dosis normalmente letales de glifosato (Powles, 2008).

En Argentina ya se ha documentado la presencia de biotipos resistentes a glifosato, como es el caso de *Sorghum halepense* y *Lolium. multiflorum*, en distintas áreas productivas del país (Vila-Aiub et al., 2007; Tuesca et al., 2007; Margueritte Paz et al., 2009). Los antecedentes mundiales de genotipos resistentes de las especies mencionadas datan de Chile (Perez-Jones y Kogan, 2003), Brasil (Roman, 2004), EEUU (Perez Jones et. al., 2005) y España (Cruz Hipólito et. al., 2008).

2.1.1. Mecanismos involucrados en la resistencia a los herbicidas

Los mecanismos involucrados en la resistencia de las malezas a herbicidas fueron clasificados por Dekker y Duke (1995). Estos autores describen dos categorías principales: mecanismos de resistencia por exclusión y mecanismos de resistencia por modificaciones en el sitio de acción.

Dentro del *mecanismo de resistencia por exclusión* se distinguen cuatro posibles mecanismos diferenciables:

- el herbicida no es eficientemente absorbido por la planta debido a características morfológicas como reducida área foliar, superproducción de ceras, presencia de pelos, estomas en criptas, entre otros (Nandula et al., 2008);
- translocación diferencial del herbicida tanto por modificaciones a nivel del apoplasto o simplasto. Es una condición necesaria para lograr la efectividad del herbicida que éste alcance su sitio de acción en una concentración suficiente como para que su efecto sea letal (Yu et al., 2009);
- compartimentalización: el herbicida es secuestrado en la vacuola y se limita la llegada al sitio de acción (Ge et al., 2010);
- detoxificación metabólica: el herbicida es metabolizado hasta perder su carácter fitotóxico lo suficientemente rápido como para que la planta no muera (Reade et al., 2004).

Respecto a los mecanismos de *resistencia por modificaciones en el sitio de acción* se distinguen dos sub-categorías:

- alteración del sitio de acción por mutaciones en el sitio diana impidiendo el acople del herbicida a la enzima blanco (Yu et al., 2007);
- superproducción del sitio de acción de manera que los efectos del herbicida se diluyen y la planta mantiene su actividad metabólica (Gaines et al., 2010).

Con respecto a lo mencionado anteriormente, Perez Jones et. al. (2007) establecieron que el mecanismo responsable de la resistencia a glifosato de *Lolium multiflorum* Lam. es debido al patrón diferencial de traslado del herbicida en plantas susceptibles y resistentes. Mediante la utilización de glifosato marcado con C¹⁴, observaron que se afecta la carga del herbicida al floema promoviendo el traslado del glifosato por la corriente xilemática hacia el ápice de la lámina foliar determinando la resistencia. Paralelamente, utilizando biotipos de *L. multiflorum* Lam. resistentes de Oregon (EEUU) y de Chile, estos autores hallaron una sustitución en la secuencia de aminoácidos de la enzima EPSPs variando prolina por serina. Esta mutación en el sitio diana reduciría la sensibilidad a glifosato como fue confirmado en *Eleusine indica* (L.) Gaertn (Baerson et. al., 2002).

No obstante, los biotipos resistentes de *L. multiflorum* Lam. tendrían dos mecanismos diferentes para sobrevivir a dosis normalmente letales de glifosato: limitada traslocación del principio activo y mutación de la enzima EPSPs (Perez Jones et. al., 2007).

2.2. Tolerancia a los herbicidas

Se define la tolerancia como la capacidad innata de una especie de sobrevivir y reproducirse luego del tratamiento con un herbicida, (Herbicide Resistant Plants Committee, 1998).

En Argentina, el reiterado uso de glifosato ha puesto de manifiesto la existencia de distintas especies de malezas tolerantes a dicho herbicida (Puricelli y Tuesca, 2005). Si bien el glifosato es un herbicida de amplio espectro, existen algunas especies que pueden tolerarlo al aplicarse las dosis habituales recomendadas. Es por ello que en un contexto de uso casi exclusivo de glifosato, posiblemente las especies con baja sensibilidad a este herbicida aumenten su abundancia, mientras que algunas malezas sensibles tiendan a desaparecer (Nisensohn y Tuesca, 2001).

Se han detectado diferentes niveles de tolerancia en especies tales como *Anoda cristata* (L.) “malva cimarrona”, *Commelina erecta* (L.) “flor de Santa Lucía”, *Oenothera indecora* (Cambess) “flor de noche”, *Parietaria debilis* (L.) “ocucha”, *Conyza bonariensis* (L.) “rama negra”, *Rumex paraguayensis* (L.) “lengua de vaca”, *Iresine diffusa* (Humb y Bonpl. Ex Willd.) “pluma”, *Trifolium repens* (L.) “trébol blanco”, *Portulaca gilliesii* (Hook) “flor de seda” y *Gomphrena perennis* (L.) “flor de papel”, entre otras (Puricelli y Faccini, 2009). Como consecuencia de ello, la capacidad de estas especies de tolerar los tratamientos de control basados en el uso de glifosato ha generado cambios en las comunidades de malezas presentes (Faccini y Puricelli, 2007). Las dosis recomendadas para controlar numerosas malezas presentes en la región pampeana oscilan entre 720 a 1440 g.e.a (gramo equivalente ácido) por Ha de glifosato y en caso que éstas presenten órganos subterráneos como mecanismo de propagación dicha dosis se incrementa hasta 2160 g.e.a/Ha.

Existen casos de malezas tolerantes que al estado adulto requieren dosis de 2400 g.e.a/Ha de glifosato o superiores, para lograr un adecuado control. Entre estas se destacan los géneros: *Portulaca sp.*, *Oenothera sp.*, *Talinum sp.*, *Modiolastrum sp.*, *Gomphrena sp.*, *Borreria sp.*, entre otros (Rainero, 2008).

Por otro lado, cabe destacar la existencia de diferentes situaciones de “escape” de una maleza al control del glifosato, cuando las condiciones para su aplicación o acción fitotóxica no son las adecuadas y por lo tanto el herbicida no alcanza su máxima eficacia. Dentro de esta categoría se han registrado en el área pampeana distintos casos, como por ejemplo *Conyza bonariensis*, donde es difícil atribuir ciertos mecanismos de tolerancia o resistencia, debido a que han sido tratadas en un estado de desarrollo avanzado y bajo estrés hídrico (Rainero, 2008).

Wu et al., (2001), establecen que la expansión de especies tolerantes a herbicidas se puede deber al tamaño de la planta, a las características morfológicas y la densidad de estas poblaciones en respuesta a las prácticas de manejo, los cambios ecológicos, las condiciones ambientales y al intercambio genético entre especies emparentadas.

2.2.1. Características morfológicas que confieren tolerancia a los herbicidas

El tejido epidérmico vegetal de la mayoría de las especies superiores se caracteriza por poseer sus células con las paredes periclinales externas más gruesas que las anticlinales y las periclinales internas. Estas dos últimas caras presentan campos de punteaduras primarias y plasmodesmos. Durante muchos años se creyó que los plasmodesmos se hallaban en las paredes epidérmicas externas y se los denominó *ectodesmos* (Franke, 1971). Investigaciones recientes han revelado que no hay cordones citoplasmáticos en las paredes externas, pero que los haces de los espacios interfibrilares se pueden extender hasta la cutícula, dentro de las paredes celulósicas. Lyshede (1982) propuso el término de *ticode* para sustituir al de *ectodesmos* y microcanales, atribuyéndose a estas estructuras la función de vía de paso en la excreción y la absorción foliar.

Las paredes periclinales externas del tejido epidérmico están cubiertas por la cutícula, quien constituye la primera barrera protectora entre la superficie aérea de la planta y el medio que la rodea y también la principal barrera frente al desplazamiento de agua y solutos, incluida la transpiración (Riederer y Schreiber, 2001). La cutícula está constituida fundamentalmente por compuestos lipídicos insolubles, la cutina, y por ceras solubles, algunas de las cuales se depositan en la superficie y otras se incluyen en la matriz (Jeffree, 1996).

Las ceras se pueden depositar en la superficie de la cutícula, constituyendo ceras epicuticulares, o estar incluidas en la matriz, denominándose cera cuticular o intracuticular. Las características de la ultraestructura de la cutícula afecta de manera importante la permeabilidad, ya que cutículas con estructura totalmente reticulada son más permeables a ciertas sustancias que otras provistas de una región lamelar externa (Gouret et al., 1993; Santier y Chamel, 1998).

Sin embargo, son las ceras cuticulares las que constituyen la barrera principal a la difusión del agua y los solutos a través de la cutícula, al crear en gran parte un camino tortuoso y, por lo tanto, más largo para las moléculas que se difunden (Schreiber et al, 1996; Buchholz y Schonherr, 2000). Estos autores demostraron que la fase amorfa de las ceras cuticulares son exclusivas para el pasaje de solutos lipofílicos, mientras que la fracción hidrofílica puede difundir a través de poros llenos de agua siendo la ruta que

probablemente siguen los compuestos orgánicos hidrosolubles y los iones inorgánicos (Schreiber et al, 2001; Beattie y Marcell, 2002).

La cutina y las ceras se sintetizan en las células epidérmicas y tienen que migrar a la superficie a través de las paredes celulares. No hay acuerdo sobre las rutas seguidas por estas sustancias ni sobre los mecanismos implicados. Algunos investigadores sugieren que los ticodes funcionan como vías de paso para la cutina y las ceras a través de las paredes (Baker, 1982; Lyshede, 1982; Anton et al, 1994). Se investigaron las ceras epicuticulares, cuyos precursores, al parecer, se producen en el retículo plasmático y se modifican en el aparato de Golgi antes de ser liberadas en el citoplasma por exocitosis (Lessire et al, 1982; Jenks et al, 1994; Kunst y Samuels, 2003). Aunque fueron detectados poros y canales en las cutículas de hojas y frutos de numerosas especies, parece que estas estructuras no están difundidas en todos los órganos vegetales (Lyshede, 1982; Miller, 1985; 1986). Algunos investigadores sugieren que los precursores de las ceras siguen un camino difuso a través de la pared y la cutícula con un disolvente volátil que luego cristaliza en la superficie foliar (Baker, 1982; Hallam, 1982). Neinhuis et al. (2001) propusieron la hipótesis que las moléculas de cera se desplazan junto con el vapor de agua que atraviesa la cutícula en un proceso semejante a la destilación por vapor.

Investigaciones de Millar et al (1999) han demostrado que el gen CUTI de *Arabidopsis thaliana* participa en la producción de cera codificando una enzima que condensa un ácido graso de cadena larga que es necesario para la producción de cera cuticular.

Otra característica morfológica importante es el área foliar, el ángulo de inserción y la posición de las hojas, el número y tamaño de estomas, tricomas y glándulas (Hess, 1985; Wanamarta y Penner, 1989).

El control de las malezas en zonas áridas generalmente es más dificultoso que en las regiones húmedas, y ello se puede atribuir, en el caso de los herbicidas de post-emergencia, a una menor área foliar y a un incremento en la capa cuticular bajo condiciones de déficit hídrico (Dall'Armellina and Zimdahl, 1989). Westwood et al. (1997) informaron que las poblaciones de *Convolvulus arvensis* L. tolerantes al glifosato poseen cutícula más gruesas y por lo tanto la absorción del herbicida es menor que en las plantas sensibles bajo condiciones de baja humedad relativa. Contrariamente, una

disminución en el espesor de la capa cuticular y en el depósito de ceras podría ser una ventaja para la penetración del herbicida y, por lo tanto, incrementar la absorción del mismo hacia los tejidos internos (Santier and Chamel, 1992).

2.2.2. Características fisiológicas que confieren tolerancia a los herbicidas

Cruz-Hipólito et al. (2009) informaron la existencia de diversas características involucradas en la tolerancia al glifosato en poblaciones de *Canavalia ensiformis*. Esto fue confirmado mediante la aplicación de (^{14}C) glifosato que encuentra una barrera impuesta por la cutícula en la epidermis de estas plantas que frena la penetración del herbicida hacia los tejidos internos. Otro mecanismo de tolerancia presente en esta especie es el ineficiente traslado del herbicida desde la zona de aplicación hacia las raíces y la zona aérea con activo crecimiento.

Cruz-Hipólito et al. (2011) demostraron menor absorción de glifosato y disminución de su traslado a las raíces y a hojas no tratadas en poblaciones de *Clitoria ternatea* y *Neonotonia wightii*, provenientes de Méjico, respecto a una especie susceptible como es *Amaranthus hybridus*. Estas respuestas coinciden con lo observado por Monquero et al. (2004) en otras especies tolerantes al glifosato y por De Prado et al, (2005) en algunos biotipos resistentes. Estos autores atribuyen la menor absorción del glifosato en estas poblaciones por la presencia de ceras epicuticulares en la superficie de las hojas.

El conocimiento de las características morfológicas de la superficie foliar de las malezas a controlar constituye una herramienta para tomar decisiones de manejo y control (Hull et al. 1982). Existen evidencias que las características de la superficie foliar, condicionan el mojado y la penetración de los herbicidas aplicados por vía foliar (Hull et al. 1982; Mc Whorter, 1980).

Cuando se aplica un herbicida sobre la superficie foliar, se inicia el proceso de absorción (Kirkwood, 1993), debiendo atravesar el producto una capa de cera epicuticular y posteriormente la cutícula, que está atravesada por ectodesmos que constituyen vías importantes para la penetración (Schonherr y Riederer, 1989; Cobb y Reade, 2010). Luego, el producto debe atravesar la pared celular y la membrana plasmática para ingresar a las células epidérmicas (Hull, 1970). El mecanismo de ingreso del glifosato a las células

se estima que se produce por dos vías, una de ellas por mecanismos activos mediada por fosfato-transportadores y otra pasiva por difusión (Shaner, 2009).

Aún se carece de información precisa acerca de las características morfo-anatómicas foliares de numerosas malezas y su relación con la absorción y penetración de herbicidas. En éste sentido es importante analizar el número y tipo de estomas, glándulas, tricomas y pelos en las caras adaxiales y abaxiales, como así también la cuantificación del contenido de ceras en la superficie de las hojas. Es por ello que el estudio y conocimiento de las características morfo-anatómicas de la superficie y anatomía de las hojas podrían contribuir a la comprensión de los mecanismos de absorción y penetración del herbicida en la planta.

Acciaresi y Chidichimo (2005) analizaron la respuesta de diferentes poblaciones de *Sorghum halepense* "sorgo de Alepo" ante la aplicación de dosis reducidas de nicosulfuron y determinaron respuestas de sensibilidad diferencial. Las poblaciones provenientes de zonas sub-húmedas tuvieron menor sensibilidad a la aplicación del herbicida posiblemente por la menor absorción foliar y traslocación respecto de aquellas provenientes de zonas húmedas. Las respuestas observadas fueron mayor peso fresco, longitud y número de rizomas que podrían incrementar la habilidad para rebrotar y producir nueva biomasa aérea.

3. *Gomphrena perennis* L. “siempre viva del campo”

3.1. Características generales y distribución geográfica

Gomphrena perennis L. flor de papel” o “siempre viva del campo” es una especie de la familia Amarantáceas, perenne, de porte erguido y de hojas pubescentes. Posee una raíz reservante llamada xilopodio que protege a yemas de origen adventicio capaces de rebrotar. Posee inflorescencias globosas, simples o ramificadas, formadas por flores hermafroditas pequeñas de color blanco–amarillentas. El fruto es un utrículo pequeño y contiene una semilla que sirve como órgano de propagación (Burkart, 1987).

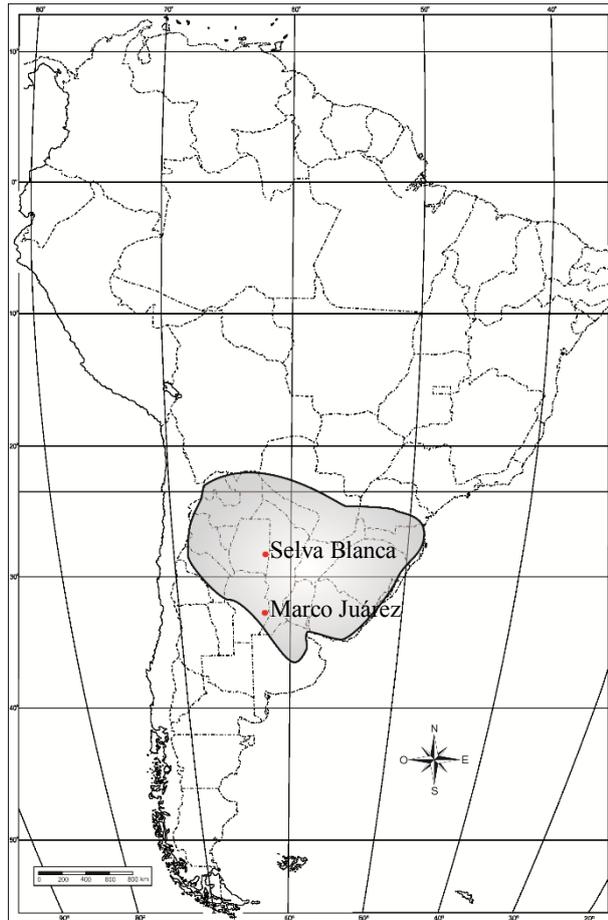
La distribución geográfica de esta especie comprende Sudamérica, fundamentalmente Paraguay, Brasil, Argentina y Uruguay. En Brasil se la encuentra en la región de Paraná,

Río Grande do Sul y Santa Catarina; en Paraguay está presente en la zona de Alto Paraguay y en Uruguay en el departamento de Rocha. (Fuente: Catálogo de las Plantas Vasculares del Cono Sur (Argentina, Sur de Brasil, Chile, Paraguay y Uruguay. 2008).

En la República Argentina su radio de distribución abarca desde el norte hasta la región pampeana, extendiéndose por las provincias de Buenos Aires, Catamarca, Chaco, Córdoba, Corrientes, Entre Ríos, Formosa, Jujuy, La Rioja, Misiones, Salta, Santiago del Estero y Tucumán.

Se manifiesta como una maleza de secundaria abundancia en cultivos perennes, montes frutales y es frecuente en rastrojos, al borde de caminos y otros terrenos modificados, prefiriendo suelos no muy húmedos (Marzocca *et al.*, 1976).

A continuación se señala el área de distribución de *G. perennis* en Sudamérica y las localidades de procedencia del material de estudio en este trabajo se señalan con puntos (Marcos Juárez (Córdoba) y Selva Blanca (Santiago del Estero), ambas situadas en la República Argentina).



Gomphrena perennis vegeta durante primavera, verano y parte del otoño pudiendo generar serios inconvenientes al final del período de barbecho y dificultar la siembra de cultivos estivales. Las plantas de *G. perennis* no controladas durante el cultivo de verano poseen tallos leñosos en su base y alcanzan una altura de aproximadamente un metro lo que dificulta las tareas de cosecha (Nisensohn et al., 2007b).

3.2 Comportamiento ecológico de *Gomphrena* en sistemas productivos

En la provincia de Santa Fe desde 2006 se han observado escapes de *G. perennis* L. en algunos establecimientos productivos luego de utilizar glifosato (Nisensohn et al. 2007a). Rainero (2008) informó que *G. perennis* es una maleza que ha visto incrementada sus poblaciones en lotes productivos de las provincias de Santiago del Estero y Chaco. Esta especie, que habitualmente se observaba en banquinas o sitios sin disturbar, se comenzó

a observar en lotes donde se implementan sistemas de SD (Nisensohn y Tuesca, 2001; Nisensohn et al.; 2007b).

Las poblaciones de *G. perennis* manifestaron diferencias a la tolerancia al glifosato dependiendo fundamentalmente del momento en el cual fue aplicado el herbicida. La dosis recomendada para su control, es de 900 g.e.a /Ha de glifosato (Round-Up) 48% aplicados en individuos en estado vegetativo (Nisensohn et al, 2007b). El nivel de control alcanzado en individuos al estado vegetativo con la dosis recomendada fue del 53%, y sólo con aplicaciones de 3600 g.e.a/Ha se logró un control adecuado (88%). Cuando las aplicaciones fueron realizadas en plantas al estado reproductivo el grado de tolerancia fue mayor, ya que con la dosis de uso el control obtenido fue de solo 13% y con la mayor dosis utilizada (7200 g.e.a/Ha) fue del 80%.

En los últimos años se observó, en amplias zonas productivas de la provincia de Santiago del Estero, una alta infestación con poblaciones de *G. perennis* L. que resultan tolerantes a la aplicación de glifosato (Pagani, O., com. pers.). Se ha evaluado el control de dichas poblaciones con otros herbicidas, aplicados solos o en mezclas con glifosato, obteniendo bajos niveles de control (Pagani, O., com. pers.). También se ha observado que en condiciones de sequía manifiestan mayor tolerancia a la aplicación de glifosato (Pagani, O., com. pers.).

Esta especie también ha invadido vastas zonas productivas de la provincia de Córdoba, comprometiendo los rendimientos y rentabilidad de los cultivos. Cortes y Venier (2012), realizaron un estudio en la zona de influencia del INTA San Francisco (Córdoba) con el objetivo de evaluar la eficacia de diferentes herbicidas y sus mezclas en el control de *G. perennis*. Los resultados obtenidos indicaron que ningún tratamiento resultó eficaz para controlar esta especie. Los resultados más exitosos se obtuvieron con la utilización de mezclas de herbicidas que incluyeron carfentrazone, flumioxazin y saflufenacil con una efectividad de 65 al 72% de control a los 23 días desde aplicación (DDA). Transcurrido este lapso de tiempo, todos los tratamientos redujeron su eficacia debido al rebrote de las plantas. Estos autores observaron que la aplicación de glifosato con una dosis de 7440 g.e.a/Ha, no superó el 15% de control a los 30 DDA.

Dada la importancia que esta especie ha adquirido en los sistemas productivos estivales de Santa Fe, Córdoba, Chaco y Santiago del Estero, es importante estudiar el comportamiento de esta maleza frente a glifosato y así alcanzar un mayor grado de conocimiento de su comportamiento, lo cual permitirá contribuir al manejo de la especie en los sistemas productivos de la región.

En este sentido, es de interés estudiar las características morfo-anatómicas de las hojas de *G. perennis* L. para verificar la presencia de estructuras que podrían comportarse como barreras mecánicas o físicas al ingreso y posterior traslado del herbicida. Asimismo, se pretende dilucidar si existen respuestas diferenciales en plantas de *Gomphrena perennis* L. provenientes de Córdoba y Santiago del Estero.

Hipótesis.

De acuerdo a los antecedentes presentados, se plantea la **hipótesis** que:

-las particulares características morfo-anatómicas de las hojas de *G. perennis* son las responsables de la tolerancia al glifosato determinando la baja sensibilidad al herbicida.

Para comprobar la hipótesis planteada en el presente trabajo se plantean los siguientes objetivos.

Objetivo general:

- Caracterizar morfo-anatómicamente las hojas de plantas de *G. perennis* provenientes de lotes de producción de las provincias de Santiago del Estero y de Córdoba.
- Determinar si dichas poblaciones de *G. perennis* poseen sensibilidad diferencial al herbicida absorbido, cuantificada por la acumulación de ácido shikímico, y si las respuestas están determinadas por las características morfo-anatómicas foliares.

Objetivo particular:

- Caracterizar las estructuras presentes en la epidermis de las hojas de *G. perennis* que podrían comportarse como una barrera mecánica para la absorción y el posterior traslado del herbicida.
- Evaluar el efecto de diferentes dosis de glifosato sobre la respuesta fisiológica y la supervivencia de plantas de *G. perennis* provenientes de ambos orígenes.

CAPÍTULO 2

MATERIALES Y METODOS

2.1. ESTUDIOS MORFO-ANÁTOMICOS DE HOJAS ADULTAS

El material estudiado consistió en hojas adultas de plantas de *G. perennis* provenientes de lotes de producción del área de influencia de Marcos Juárez (provincia de Córdoba, Lat. 32° 41' 00" S; Long. 62° 09' 00" W) y de la zona de Selva Blanca cercana a INTA Banderas (provincia de Santiago del Estero Lat. 28° 28' 00" S; Long. 62° 06' 00" W).

En el mes de marzo del año 2011 de lotes seleccionados de ambos orígenes se tomaron 50 plantas adultas al azar las que fueron herborizadas, embaladas y remitidas al laboratorio del INFIVE (UNLP). Del material recibido se tomaron 10 plantas al azar y 3 hojas adultas por planta.

Se procedió a lavar el material con agua destilada y se fijó en una solución de FAA (formaldehído, ácido acético, etanol), hasta su análisis microscópico.

2.1.1. Superficie foliar:

Para los estudios epidérmicos con microscopía óptica (MO) se empleó la técnica de diafanización de Dizeo de Strittmater (1986). Las observaciones y microfotografías se realizaron con un microscopio Nikon Photolab II.

El estudio de las cutículas y ceras se realizó con microscopio electrónico de barrido (MEB) Jeol JSM-35 CF perteneciente al Servicio de Microscopía Electrónica de la Facultad de Ciencias Naturales y Museo (UNLP). Las muestras fueron montadas sobre las platinas sin tratamiento químico previo y metalizadas con un baño de oro-paladio.

Los aspectos observados en la superficie foliar fueron:

-Características de las células epidérmicas (forma y ondulaciones de las paredes anticlinales), tricomas (tipo, número de células y longitud) y estomas (tipo y número por mm²)

-Ornamentación de la cutícula y morfología de las ceras epicuticulares.

En este trabajo se utilizó la terminología propuesta por Metcalfe and Chalk (1988) para la descripción de los tricomas. El número de células presentes en los pelos uniseriados fue determinado analizando 30 de ellos por muestra en hojas adultas.

Para la descripción de los estomas se adoptó la clasificación propuesta por Metcalfe & Chalk (1988).

Se calculó el número de estomas por mm² en las superficies adaxial y abaxial de hojas de ambas procedencias, con 10 repeticiones por muestra.

La descripción de la ornamentación de la cutícula fue realizada mediante una adaptación de la terminología de Wilkinson (1979). Para el estudio de las ceras epicuticulares se utilizó la clasificación propuesta por este mismo autor.

2.1.2. Anatomía:

Para el estudio anatómico las muestras de hojas adultas fijadas previamente en FAA fueron deshidratadas en una serie ascendente de alcoholes e incluidas en Paraplast. Los cortes (10-12 µm) se realizaron con micrótopo rotativo. Estos fueron coloreados con safranina-fast-green.

Se consideró la estructura general, el tipo y espesor del clorénquima en cortes transversales en base a 10 mediciones, en la mitad de la lámina.

2.2. ANALISIS FISIOLÓGICO DE LA RESPUESTA A DIFERENTES DOSIS DE GLIFOSATO

Los ensayos fueron realizados a partir de semillas colectadas de plantas de *G. perennis* provenientes de lotes de producción de la zona de influencia de INTA Banderas (provincia de Santiago del Estero) y de INTA Marcos Juárez (provincia de Córdoba).

Las semillas se recolectaron de plantas espontáneas que rebrotaron y fructificaron debido al control deficiente de estas malezas durante el período de barbecho que antecedió al cultivo de soja en la campaña 2010-11.

Para poner a prueba los objetivos planteados en el proyecto se realizó un experimento que consistió en un arreglo factorial (2 x 2) siguiendo un diseño completamente aleatorizado (DCA) con los siguientes factores principales:

Factor 1: poblaciones de *Gomphrena* provenientes de Santiago del Estero y de Córdoba,

Factor 2: se cultivaron las plántulas en situaciones de crecimiento diferenciales: condiciones semi-controladas (en invernadero), y condiciones naturales de temperatura, humedad e irradiancia para la zona de La Plata (intemperie).

De las 50 plantas adultas de cada origen recibidas en el INFIVE (UNLP), se recolectaron las inflorescencias, se uniformó el cúmulo de semillas y al azar se sembraron 300 macetas.

Se llenaron con suelo 300 macetas de 200 cm³ y se sembraron en 150 de ellas, semillas de la población proveniente de Santiago del Estero, y en las otras 150 macetas restantes, semillas de Córdoba. Las mismas se colocaron en un invernadero bajo condiciones semi-controladas de temperatura, humedad e irradiancia. Se sembraron 5 semillas por maceta y una vez que las plántulas tuvieron los cotiledones totalmente expandidos se efectuó el raleo para mantener dos plántulas por recipiente.

Se obtuvieron 75 macetas (150 plántulas) para cada población y para cada situación de crecimiento.

Las plántulas que se mantuvieron en invernadero, crecieron en condiciones controladas de temperatura y óptima disponibilidad hídrica (capacidad de campo). Se fertilizó con

Nitrofoska Basf (15-15-6-4) cada quince días. No se observaron síntomas de deficiencia de nutrientes.

Las plántulas que crecieron a la intemperie lo hicieron en las condiciones de temperatura e irradiación natural para la zona de La Plata, recibiendo suplemento de riego y fertilización cuando fue necesario.

Los datos climatológicos se presentan en el Anexo II.

2.2.1. Aplicación del glifosato:

Cuando las plantas alcanzaron el estadio fenológico de 3-4 hojas expandidas se iniciaron los tratamientos de aplicación de diferentes dosis de glifosato con 10 repeticiones. Para ello se distribuyeron las plantas de cada tratamiento en 1 m² y se aplicó el volumen equivalente a dicha superficie con la concentración de glifosato correspondiente a cada tratamiento.

La aplicación se llevó a cabo con un aspersor calibrado para el volumen de referencia (20 cm³ por m²).

Cada tratamiento consistió en la aplicación de glifosato (Roundup Full II® 54% equivalente ácido p/v) con las siguientes dosis:

T0: Control: 0 g.e.a/Ha,

T1: 180 g.e.a/Ha,

T2: 360 g.e.a/Ha,

T3: 720 g.e.a/Ha,

T4: 1440 g.e.a/Ha,

T5: 2880 g.e.a/Ha,

T6: 5760 g.e.a/Ha.

La dosis comercial recomendada para el control de *G. perennis* L. está representada por 1440 (T4) g. e. ácido/Ha (Monsanto Argentina SAIC).

Luego de realizada la aplicación de glifosato, las plántulas siguieron creciendo en las situaciones mencionadas anteriormente y se realizaron las siguientes determinaciones.

2.2.2. Determinaciones fisiológicas:

2.2.2.1. Evaluación de la acumulación de ácido shikímico (AS) en raíces (R), hojas basales (HB) y hojas apicales (HA).

Se determinó el contenido de AS a las 24 - 48 y 72 hs post-aplicación del herbicida (HPA) en raíces (R), hojas basales (HB) y hojas apicales (HA).

Estas determinaciones fueron efectuadas por triplicado en las plantas de ambas poblaciones bajo estudio y para ambos ambientes de cultivo.

La técnica utilizada es la descrita por Singh and Shaner (1998) y los resultados obtenidos se expresaron en μg Acido Shikímico/g.Peso Fresco (μg AS/gPF).

El diseño fue aleatorizado con tres repeticiones y los datos fueron analizados por medio de la prueba de Anova ($p < 0,05$ y $p < 0,01$). El programa utilizado fue Estadística 7.1.

2.2.2.2. Evaluación del índice de verdor (IV).

Los primeros síntomas visibles de la acción del glifosato se reflejan como una clorosis incipiente a los 7-10 días de aplicado el producto (CASAFE, 2005). Se determinó el IV mediante la utilización un medidor Minolta® SPAD 502, que permite realizar determinaciones no destructivas. Las determinaciones se realizaron a los 2-3-7 y 10 días post-aplicación (DPA) de glifosato.

El valor de verdor obtenido por planta fue el promedio de tres mediciones efectuadas en el tercio medio de la penúltima hoja expandida.

Los datos obtenidos fueron analizados mediante el programa estadístico Statística 7.1. Se realizó el análisis de la varianza (ANOVA) y para la separación de medias se utilizó el test de Tukey.

2.2.2.3. Intercambio Neto de Carbono (INC).

Se efectuaron determinaciones de INC mediante la utilización de un analizador de gas en infrarrojo IRGA CIRAS-2 PP System. Se registró la Fotosíntesis neta (PN), transpiración (E) y conductancia estomática (Sc) en plantas de ambas poblaciones y situaciones de crecimiento.

Las determinaciones fueron realizadas por triplicado en plantas control sin aplicación de herbicida (T0) y en T4 (Dosis recomendada): 1440 g,e,a/Ha, a los 7 días PA del herbicida.

Los valores obtenidos de PN se expresaron en $\mu\text{moles CO}_2\text{m}^{-2}\text{seg}^{-1}$; los de E en $\text{mmoles H}_2\text{Om}^{-2}\text{seg}^{-1}$ y los de Sc en $\text{mmoles H}_2\text{Om}^{-2}\text{seg}^{-1}$.

Los datos obtenidos se analizaron mediante el programa Statística 7.1. Se realizó el análisis de la varianza (ANOVA) y para la separación de medias se utilizó el test de Tukey.

2.2.2.4. Supervivencia al herbicida.

Se evaluó la eficiencia en el control mediante la observación de las plantas sobrevivientes a los 15 DPA del glifosato.

A los 30 DPA se realizó la cosecha de las plantas, se seccionaron en parte aérea y parte radicular, se colocaron en estufa a $80\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta peso constante, para registrar el peso seco aéreo (PSA) y peso seco radicular (PSR).

Se tomó registro del rebrote observado en la zona del cuello de la planta y se pesaron las yemas en actividad (PSY).

Los datos obtenidos fueron analizados mediante el programa estadístico Statística 7.1. Se realizó el análisis de la varianza (ANOVA) y para la separación de medias se utilizó el test de Tukey.

CAPÍTULO 3

RESULTADOS

3.1. RESULTADOS DEL ESTUDIO MORFO-ANATÓMICO DE HOJAS ADULTAS

Las hojas de *G. perennis* de ambas procedencias son simples, con filotaxis opuesta y sin presencia de anexos foliares, lígulas ni estípulas.

3.1.1. Venación:

Las hojas de ambas procedencias presentan un patrón de venación reticulado, con las venillas de mayor orden terminando libremente en las areolas (Lámina 1, Imagen A y B).

3.1.2. Superficie foliar

3.1.2.1. Características de las células epidérmicas, tricomas y estomas.

-Forma de las células epidérmicas

En las hojas de ambas procedencias las células de la epidermis adaxial y abaxial son levemente alargadas, con paredes con sinuosidades profundas. Las células meristemoides de los pelos son de forma aproximadamente isodiamétrica y con paredes rectas. Estas células se hallan rodeadas de células epidérmicas comunes generalmente de disposición radiada (Lámina 1, Imagen E).

-Tricomas

Las hojas de ambas procedencias presentan tricomas simples (no ramificados), pluricelulares, uniseriados y no glandulares. Las células basales son redondeadas y las células apicales aguzadas (Lámina 1, Imagen F).

Las uniones de las células que conforman el pelo son de tipo nodosas y éste presenta en toda la superficie abundantes depósitos de ceras asociados a los teicodes (Lámina 2, Imagen A y B).

La longitud y densidad de los tricomas se muestran en la Tabla 1.

Tabla 1. Longitud y número de tricomas en hojas de *G. perennis* procedentes de Córdoba y Santiago del Estero.

	Córdoba		Santiago del Estero	
	Cara adaxial	Cara abaxial	Cara adaxial	Cara abaxial
Número de tricomas/mm²	9.5 ± 2	9.8 ± 1.5	27.9 ± 4	45 ± 5.
Longitud de tricomas (μ)	27.9 ± 5.5	30.1 ± 4.1	36.6 ± 7.9	44.2 ± 4.5
Número de células por tricoma	4 ± 1	5 ± 1	5 ± 1	6 ± 1

La densidad de tricomas presentes en la superficie foliar de las plantas provenientes de Santiago del Estero es significativamente más alta, ($p < 0.01$) en ambas superficies, respecto a las plantas que proceden de Córdoba. (Lámina 1; Imagen C y D),

En las hojas de ambas procedencias se observa que la epidermis adaxial posee tricomas de menor longitud respecto a la cara abaxial, sin diferencias significativas.

Las hojas de las plantas que provienen de Santiago del Estero registran pelos de mayor longitud que sus pares cordobesas, con diferencias estadísticamente significativas para este parámetro ($p < 0.01$).

El número de células que constituyen el tricoma, registra menor valor para las plantas provenientes de Córdoba que sus pares santiagueñas pero no se registran diferencias significativas ($p > 0.05$).

-Estomas

Los estomas son de tipo anomocítico y las células que rodean las oclusivas no difieren del resto de las epidérmicas (Lámina 2, Imagen C). Los mismos se registran tanto en la epidermis adaxial como en la abaxial.

Tabla 2. Número de estomas presentes por mm² en hojas de *G. perennis* procedentes de Córdoba y Santiago del Estero.

	Córdoba		Santiago del Estero	
	Cara adaxial	Cara abaxial	Cara adaxial	Cara abaxial
Número de estomas/mm ²	54 ± 5.	36 ± 2	40 ± 5.	38 ± 5.

La cara adaxial de las hojas pertenecientes a las plantas procedentes de Córdoba poseen mayor número de estomas por mm² que la cara abaxial, con diferencias significativas ($p < 0.01$) Las hojas de las plantas provenientes de Santiago del Estero poseen similar densidad estomática en ambas superficies, sin que se registren diferencias estadísticas ($p > 0.05$). (Tabla 2).

-Ornamentación de la cutícula

La epidermis de las hojas de ambos orígenes están cubiertas por una delgada cutícula lisa.

3.1.2.2. Morfología de las ceras epicuticulares

En las hojas de ambas procedencias las ceras epicuticulares se disponen en forma de escamas y en algunas ocasiones en forma de discos (Lámina 2, Imagen D y E).

En las hojas de ambas procedencias que fueron tratadas con la dosis recomendada de glifosato (1440 g.e.a/Ha) se observa un aparente incremento en el depósito de ceras en la superficie foliar (Lámina 2, Imagen F).

3.1.3. Anatomía

-Lámina:

En la sección transversal del material correspondiente a ambas procedencias se observa la epidermis uniestratificada tanto en la superficie adaxial como abaxial. La epidermis adaxial está cubierta por una cutícula delgada y posee células de gran tamaño que representan aproximadamente un 92% de la superficie total de la hoja. Las células meristemoides de los pelos son de mayor tamaño y se encuentran elevadas respecto a las demás epidérmicas (Lámina 3, Imagen A).

Los estomas se registran en ambas epidermis (hojas anfiestomáticas). Las células oclusivas se encuentran ubicadas a nivel respecto a las células epidérmicas comunes (Lámina 3, Imagen A y B).

La epidermis adaxial se halla en contacto con el clorénquima mientras que hacia la cara abaxial se diferencia una hipodermis parénquimática (Lámina 3, Imagen A y C).

Las hojas de ambas procedencias poseen estructura Kranz de tipo “atriplicoide”. Los haces vasculares se encuentran rodeados completamente o casi completamente por una amplia vaina parenquimática, que contiene abundantes cloroplastos ubicados en forma centrípeta. El mesófilo circundante se dispone de manera radiada y presenta cloroplastos más pequeños y de posición centrípeta.

En el haz medio, el clorénquima radiado y la vaina con cloroplastos se hallan interrumpidos abaxial y adaxialmente por células parenquimáticas. En posición hipodérmica se observan células con engrosamientos colenquimatosos. Asimismo, en este haz se observan células cambiales entre xilema y floema (Lámina 3, Imagen D).

En los haces mayores (secundarios), el clorénquima se halla interrumpido abaxialmente por células con engrosamientos colenquimatosos y las células abaxiales de la vaina contienen escasos cloroplastos (Lámina 3, Imagen D).

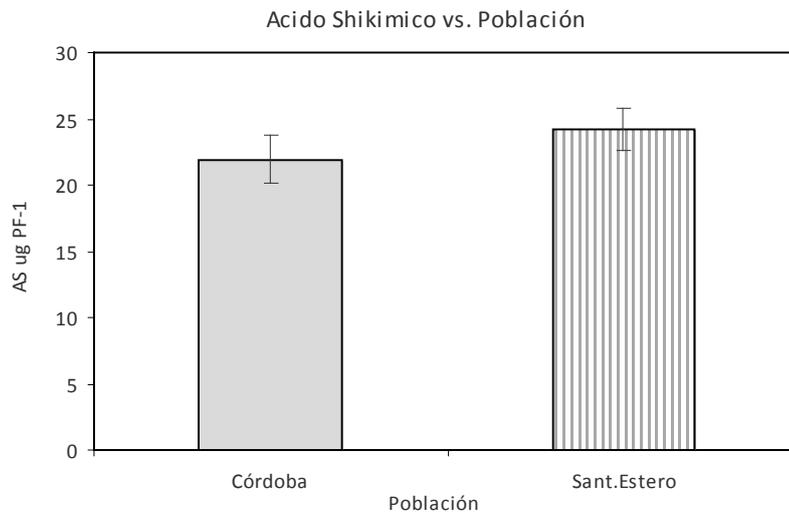
Se observan entre los haces vasculares células parenquimáticas incoloras de gran tamaño, algunas de las cuales contienen drusas (Lámina 3, Imagen D y E).

El recuento de las drusas en las plantas provenientes de Córdoba fue de 31/mm² y las de Santiago del Estero de 20/mm², manifestando diferencias altamente significativas entre ambas procedencias según test de Tukey ($p < 0.001$).

3.2. ANALISIS FISIOLÓGICOS DE LA RESPUESTA A DIFERENTES DOSIS DE GLIFOSATO

3.2.1. Acumulación de Acido Shikímico (AS)

Gráfico 1. Contenido de Acido Shikímico (AS) expresado en $\mu\text{g.gPF}^{-1}$ acumulado en plantas provenientes de Córdoba y Santiago del Estero.



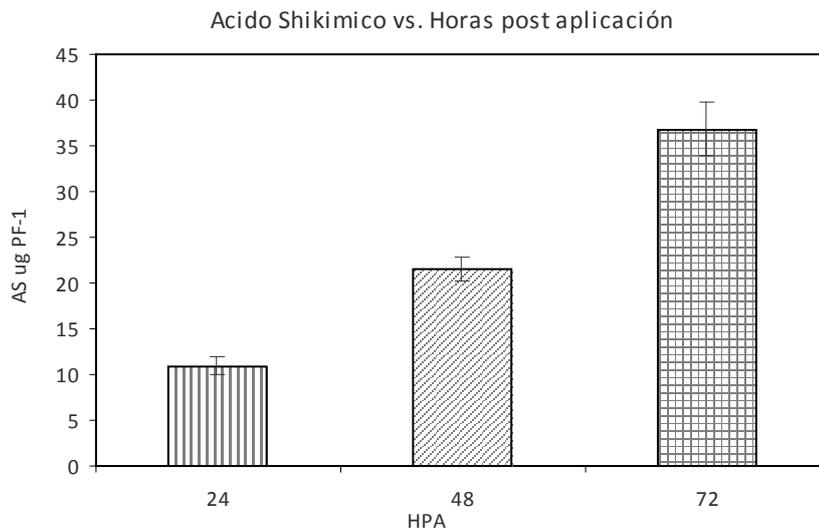
Se determinó que el contenido de AS no manifestó diferencias estadísticamente significativas entre ambas poblaciones para todas las dosis de glifosato analizadas, a partir del análisis de medias (ANOVA).

Tabla 3. Valor de probabilidad (P) obtenido a partir del análisis de medias (ANOVA) del efecto ejercido por el Ambiente donde crecieron las plantas sobre el contenido de ácido shikímico (AS).

Fuente de variación	SS	GL	MS	F	P valor
Ambiente	1440,5	1	1440,5	1,3320	0,2488

Los valores de P obtenidos indicaron que el ambiente no ejerció un efecto estadísticamente significativo sobre la acumulación de AS.

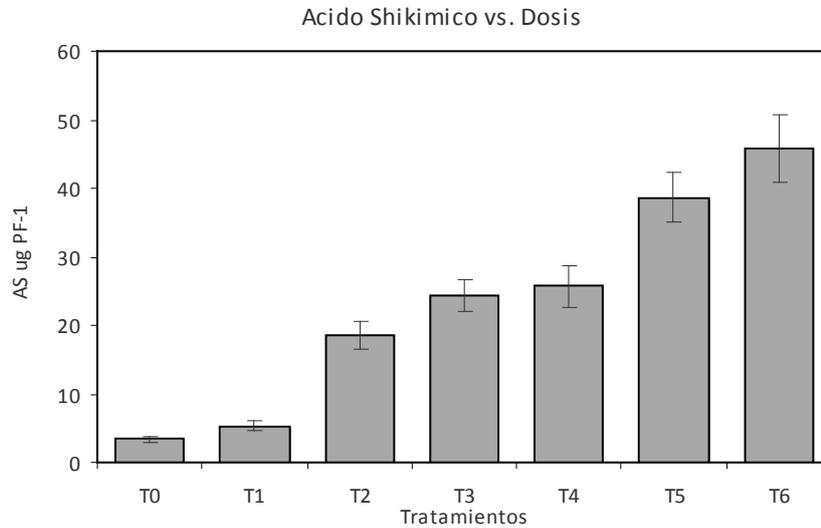
Gráfico 2. Contenido de Acido Shikímico (AS) expresado en $\mu\text{g.gPF}^{-1}$ a las 24, 48 y 72 horas post-aplicación (HPA) del herbicida.



Se determinó que el contenido de AS fue incrementándose significativamente con el transcurso de las HPA del glifosato. Los mayores registros pertenecen a las determinaciones realizadas a las 72 HPA mientras que los niveles más bajos pertenecen a las determinaciones realizadas a las 24 HPA. Estos resultados se observaron en ambas poblaciones y en todos los órganos estudiados.

Estos resultados se obtuvieron a partir del análisis de medias (ANOVA).

Gráfico 3. Contenido de Acido Shikímico (AS) expresado en $\mu\text{g.gPF}^{-1}$ según las diferentes dosis de glifosato.

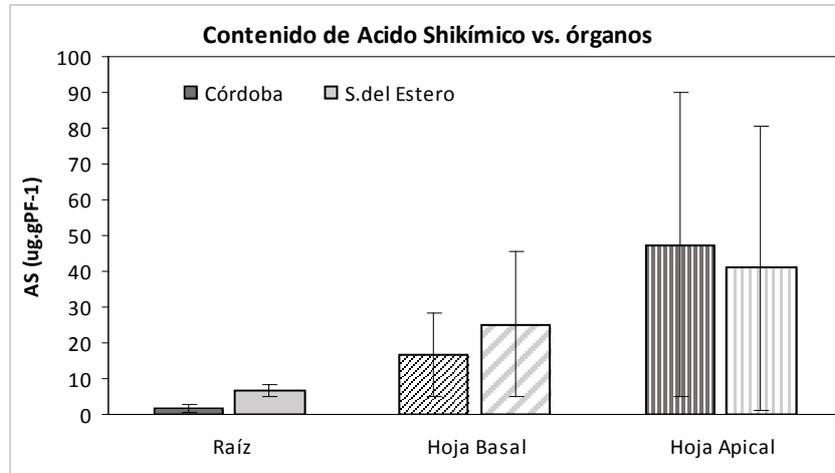


Se observaron aumentos en la acumulación de AS a medida que se incrementó la dosis de glifosato aplicado, en ambas poblaciones.

Los mayores niveles de AS se registraron en T5 y T6 con diferencias estadísticamente significativas del resto de los T evaluados.

La DR (T4) no difiere de T3 pero sí de las dosis más bajas aplicadas en este ensayo. El control (T0) difiere del resto de los T realizados indicando que el glifosato aumentó los niveles de AS

Gráfico 4. Contenido de Acido Shikímico (AS) expresado en $\mu\text{g.gPF}^{-1}$ en Raíz (R), Hoja basal (HB) y hoja apical (HA).



Se observa que los órganos que presentaron menor acumulación de AS son las R, y que las HA registraron los mayores registros. Las HB manifestaron niveles intermedios y ésta tendencia se registró en el material de ambos orígenes.

Tabla 4. Valores de probabilidad (P) obtenidos a partir de los correspondientes análisis de medias (ANOVA) del contenido de AS según el efecto de la Población (Pobl), Dosis de glifosato (Dosis), Horas Post-aplicación (HPA), Organo vegetal (Órgano) y las interacciones resultantes.

Fuente de variación	SC	GL	MS	F	P valor
Pobl	968,0	1	968,0	12,35	$\leq 0,001$
Dosis	159257,8	6	26543,0	338,57	$\leq 0,001$
HPA	84877,3	2	42438,7	541,32	$\leq 0,001$
Organo	201349,7	2	100674,9	1284,15	$\leq 0,001$
Pobl*Dosis	16441,6	6	2740,3	34,95	$\leq 0,001$
Pobl*HPA	702,3	2	351,1	4,48	0,012

Dosis*HPA	58584,9	12	4882,1	62,27	$\leq 0,001$
Pobl*Organo	7738,5	2	3869,3	49,35	$\leq 0,001$
Dosis*Organo	94665,7	12	7888,8	100,62	$\leq 0,001$
HPA*Organo	41930,4	4	10482,6	133,71	$\leq 0,001$
Pobl*Dosis*HPA	11194,9	12	932,9	11,90	$\leq 0,001$
Pobl*Dosis*Organo	31840,9	12	2653,4	33,84	$\leq 0,001$
Pobl*HPA*Organo	3400,9	4	850,2	10,84	$\leq 0,001$
Dosis*HPA*Organo	31211,2	24	1300,5	16,59	$\leq 0,001$
Pobl*Dosis*HPA*Organo	18456,6	24	769,0	9,80	$\leq 0,001$

Los resultados obtenidos indicaron una respuesta diferencial en el contenido de AS para los dos orígenes en estudio, las diferentes dosis de glifosato aplicadas, las HPA y los órganos vegetales analizados.

Se registró significancia estadística en el contenido de AS acumulado para las interacciones dobles y triples entre las variables mencionadas (Tabla 4).

3.2.1.1. Contenido de AS acumulado en Raíz (R)

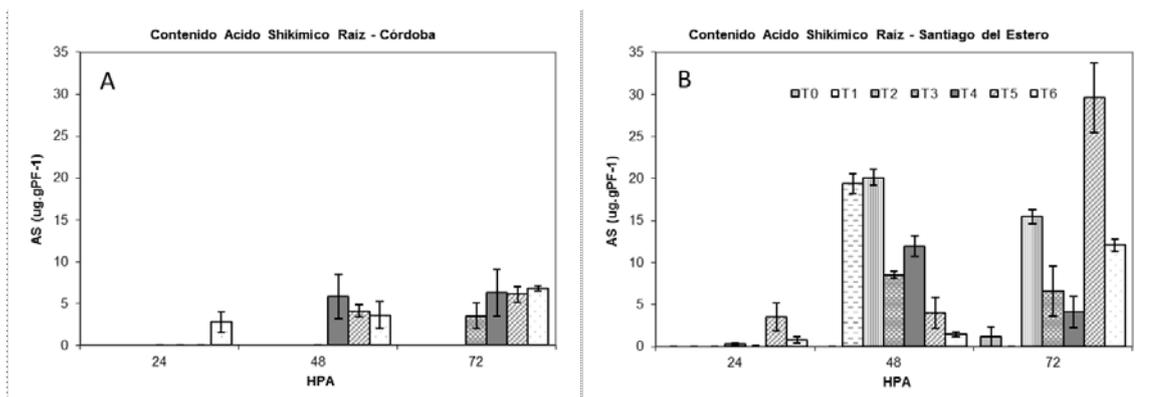
El contenido de AS en R indicó una respuesta diferencial para los orígenes en estudio, los dos ambientes de crecimiento de las plantas, las diferentes dosis aplicadas y las HPA del herbicida.

Se registró significancia estadística en el contenido de AS acumulado en R para las interacciones dobles y triples entre las variables mencionadas (Tabla 5).

Tabla 5. Valores de probabilidad (P) obtenidos a partir de los correspondientes análisis de medias (ANOVA) del contenido de AS en R, según el efecto de la Población (Pobl.), Dosis de glifosato (Dosis), Horas Post-aplicación (HPA) y las interacciones resultantes.

Fuente de Variación	SC	GL	MS	F	P valor
Pobl	1412,6	1	1412,62	1048,56	≤ 0,001
Dosis	1251,7	6	208,63	154,87	≤ 0,001
HPA	1782,7	2	891,35	661,64	≤ 0,001
Pobl*Dosis	1092,1	6	182,012	135,11	≤ 0,001
Pobl*HPA	636,8	2	318,40	236,35	≤ 0,001
Dosis*HPA	2572,9	12	214,41	159,16	≤ 0,001
Pobl*Dosis*HPA	2034,8	12	169,57	125,87	≤ 0,001

Gráfico 5. Contenido de Acido Shikímico (AS) expresado en $\mu\text{g.gPF}^{-1}$ acumulado en Raíz (R) en plantas provenientes de Córdoba (A) y Santiago del Estero (B).



Las mediciones se registraron a las 24-48 y 72 horas post-aplicación del herbicida (HPA). Los tratamientos (T) realizados son: T0 (control, sin aplicación), T1 (180 meq. ácido), T2 (360 meq. ácido), T3 (720 meq. ácido), T4 (1440 meq. ácido), T5 (2880 meq. ácido) y T6 (5760 meq. ácido).

Las R de las plantas provenientes de Marcos Juárez (Córdoba) registraron bajos niveles de AS en todos los T realizados desde las 24 hasta las 72 HPA del herbicida. Con el transcurso del tiempo no se vio incrementado el contenido de AS en estos órganos.

Las raíces de las plantas provenientes de Santiago del Estero manifestaron bajos niveles de AS a las 24 HPA, pero a las 48 horas se observó un contenido significativamente mayor en T1 y T2.

A las 72 HPA el contenido de AS se incrementó para T2, T3, T4, T5 y T6 pero con diferencias significativamente mayores para T5.

3.2.1.2. Contenido de AS en Hojas Basales (HB)

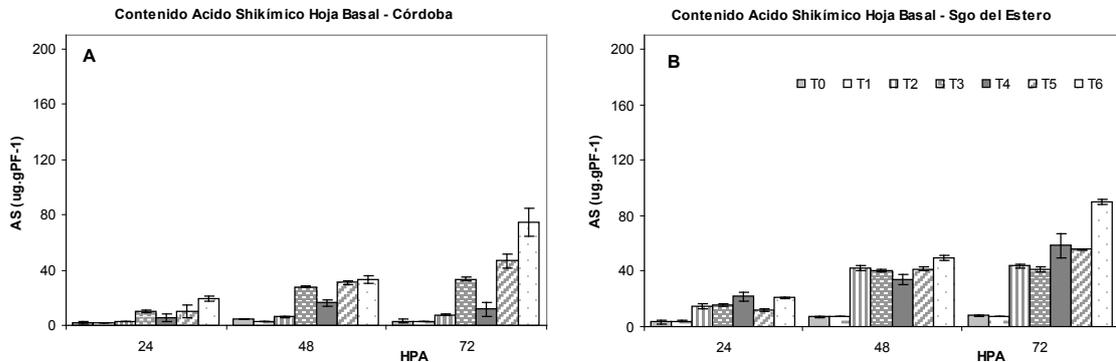
El contenido de AS en las HB indicó una respuesta diferencial para las poblaciones en estudio, las diferentes dosis aplicadas y las HPA del herbicida (Tabla 6).

Tabla 6. Valores de probabilidad (P) obtenidos a partir de los correspondientes análisis de medias (ANOVA) del contenido de AS en HB, según el Efecto de la Población (Pobl.), Dosis de glifosato (Dosis), Horas Post-aplicación (HPA) y las interacciones resultantes.

Fuente de Variación	SC	GL	MS	F	P valor
Pobl	4663,8	1	4663,8	1164,32	≤ 0,001
Dosis	51898,4	6	8649,7	2159,41	≤ 0,001
HPA	24272,1	2	12136,0	3029,77	≤ 0,001
Pobl*Dosis	8983,2	6	1497,2	373,78	≤ 0,001
Pobl*HPA	1303,6	2	651,8	162,72	≤ 0,001
Dosis*HPA	17963,2	12	1496,9	373,71	≤ 0,001
Pobl*Dosis*HPA	2546,2	12	212,2	52,97	≤ 0,001

Se registró significancia estadística en el contenido de AS en HB para la interacción triple.

Gráfico 6. Contenido de Acido Shikímico (AS) expresado en $\mu\text{g.gPF}^{-1}$ en Hojas Basales (HB) en plantas provenientes de Córdoba (A) y Santiago del Estero (B).



Las mediciones se registraron a las 24-48 y 72 horas post-aplicación del herbicida (HPA). Los tratamientos (T) realizados son: T0 (control, sin aplicación), T1 (180 meq. ácido), T2 (360 meq. ácido), T3 (720 meq. ácido), T4 (1440 meq. ácido), T5 (2880 meq. ácido) y T6 (5760 meq. ácido).

El contenido de AS registrado en HB de las plantas de Córdoba a las 24 HPA son bajos pero se incrementaron con el transcurso del tiempo.

A las 48 HPA los mayores registros se observan en T3, T4, T5 y T6 con diferencias significativas respecto a T0, T1 y T2.

A las 72 HPA los niveles de AS se incrementan significativamente en T3, T5 y T6 respecto a las otras dosis evaluadas (Gráfico 6 A).

Las plantas de Santiago del Estero a las 24 HPA registraron niveles bajos de AS en sus HB, con incrementos estadísticamente significativos a las 48 y 72 HPA. Los mayores registros se observan en T2, T3, T4, T5 y T6 con diferencias significativas respecto a T0 y T1 (Gráfico 6B).

Los niveles de acumulación de AS registrados en las HB de las plantas de Santiago del Estero son más elevados que los de sus pares provenientes de Córdoba.

3.2.1.3. Contenido de AS en Hojas Apicales (HA)

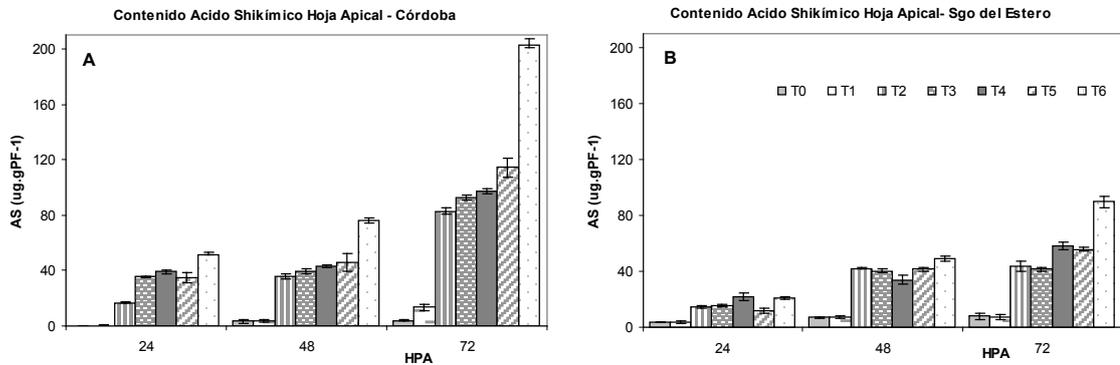
El contenido de AS en las HA indicó una respuesta diferencial para las poblaciones en estudio las diferentes dosis aplicadas y las HPA del herbicida (Tabla 7).

Se registró significancia estadística en el contenido de AS acumulado en HA para las interacciones dobles y triple.

Tabla 7. Valores de probabilidad (P) obtenidos a partir de los correspondientes análisis de medias (ANOVA) del contenido de AS en HA, según el Efecto de la Población (Pobl), Dosis de glifosato (Dosis), Horas Post-aplicación (HPA) y las interacciones resultantes.

Fuente de variación	SC	GL	MS	F	P valor
Pobl	2629,0	1	2629,0	154,78	$\leq 0,001$
Dosis	194769,9	6	32461,7	1911,15	$\leq 0,001$
HPA	99026,8	2	49513,4	2915,06	$\leq 0,001$
Pobl*Dosis	38075,8	6	6346,0	373,61	$\leq 0,001$
Pobl*HPA	2173,6	2	1086,8	63,98	$\leq 0,001$
Dosis*HPA	68133,8	12	5677,8	334,28	$\leq 0,001$
Pobl*Dosis*HPA	25064,9	12	2088,7	122,97	$\leq 0,001$

Gráfico 7. Contenido de Acido Shikímico (AS) expresado en $\mu\text{g.gPF}^{-1}$ en Hojas Apicales (HA) en plantas provenientes de Córdoba (A) y Santiago del Estero (B).



Las mediciones se registraron a las 24-48 y 72 horas post-aplicación (HPA). Los tratamientos (T) realizados son: T0 (control, sin aplicación), T1 (180 meq. ácido), T2 (360 meq. ácido), T3 (720 meq. ácido), T4 (1440 meq. ácido), T5 (2880 meq. ácido) y T6 (5760 meq. ácido).

En ambas poblaciones, se registró que son las HA quienes contienen los mayores niveles de AS.

Las plantas de Córdoba T0 y T1 son las que registraron los niveles más bajos de AS y ésta tendencia se sostuvo a las 24-48 y 72 HPA.

Los contenidos de AS significativamente más altos se registraron en T2, T3, T4, T5 y T6 a las 24, 48 y 72 HPA.

Los mayores niveles de AS se registraron en las plantas tratadas con las mayores dosis (T5 y T6) a las 72 HPA (Gráfico 7A).

Las plantas de Santiago del Estero que registraron los menores contenidos de AS en sus HA son las T0 y T1 a las 24 HPA. Esta tendencia se mantuvo en las determinaciones realizadas posteriormente siendo los tratamientos que menor AS registraron.

Mientras que T2, T3, T4, T5 y T6 registraron AS con valores significativamente más altos.

A las 48 HPA T0 y T1 fueron los que registraron menor acumulación y se diferenciaron del resto de los T realizados que tuvieron niveles de AS significativamente más elevados. Esta tendencia se sostuvo a las 72 HPA(Gráfico 7B).

Los resultados obtenidos de contenido de AS en HA, manifestaron un patrón de respuesta similar en ambos orígenes, siendo Córdoba quien registró los contenidos más elevados.

3.2.2. Índice de Verdor (IV) mediante el uso del SPAD Minolta

Gráfico 8. Dosis de inhibición media (I50) (expresado en unidades Spad) en plantas provenientes de Córdoba y Santiago del Estero cultivadas en invernáculo e intemperie a los 10 DPA.

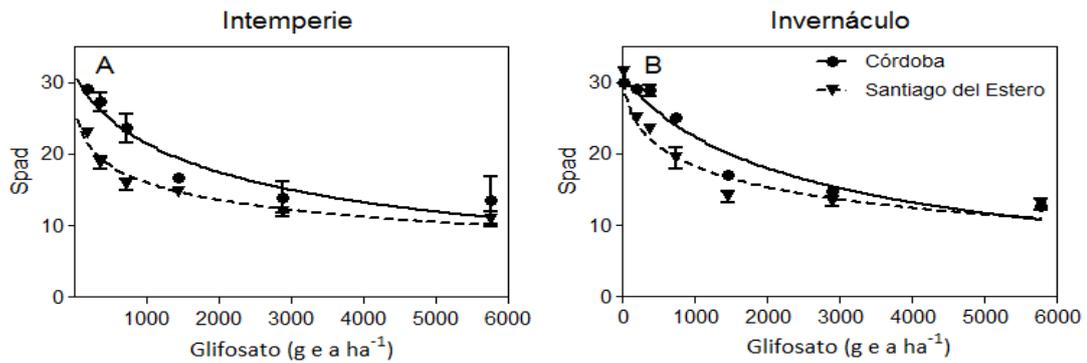


Tabla 8. Valores de probabilidad (P) y R² obtenidos del análisis de regresión del Índice de Verdor (IV) según la Población (C y SE) y Lugar de crecimiento (intem. e inv.) a los 10 Días Post-aplicación (DPA) de glifosato.

	C (Spad)	D (Spad)	I50 (g ea ha-1)	b	P	R2
C intem	0	31,6	2583	0,77	<0,01	0,93
C inv	0	31,1	2811	0,89	<0,01	0,94
SE intem	0	29,2	1455	0,47	<0,01	0,97
SE inv	0	31,8	1723	0,53	<0,01	0,94

A los 10 DPA del glifosato las curvas ajustaron al modelo de Streibig y Kudsk, (1993) ya que en ese momento están definidas las diferencias de verdor entre los tratamientos evaluados. Según la prueba de F para el parámetro I50 (Dosis de inhibición media), indicó

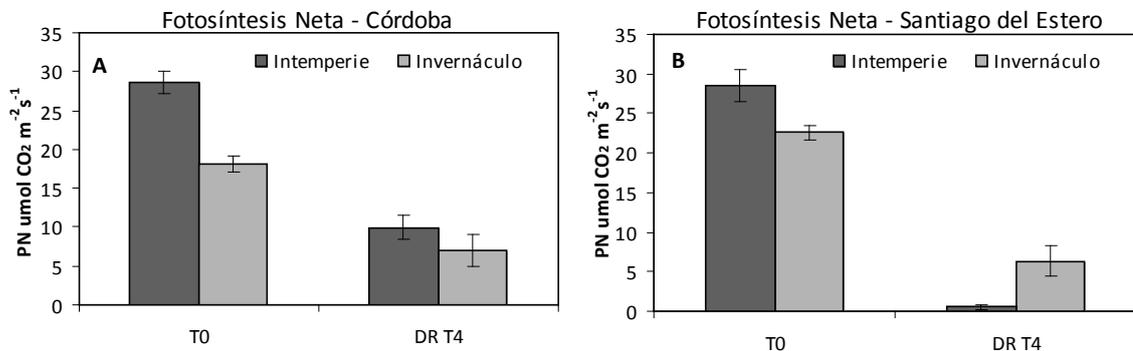
que tanto en invernáculo como intemperie la I50 de ambas poblaciones fue significativamente diferente.

Los valores obtenidos indicaron una mayor susceptibilidad al glifosato en las plantas de Santiago del Estero cultivadas a la intemperie, ya que el verdor (expresado en unidades SPAD) fue menor que en las plantas provenientes de Córdoba.

3.3. Determinación de parámetros metabólicos

3.3.1. Fotosíntesis Neta (PN)

Gráfico 9. Fotosíntesis Neta (PN) expresado en $\mu\text{mol CO}_2\text{m}^{-2}\text{seg}^{-1}$ en plantas provenientes de Córdoba y Santiago del Estero cultivadas en invernáculo e intemperie (A y B respectivamente).



Las mediciones se registraron en los tratamientos control (T0) y T4 (1440 g.e.a: DR) a los 7 días post-aplicación del herbicida (DPA).

Los valores de PN registrados en T0, para ambos orígenes y ambientes de crecimiento, fueron significativamente más altos comparados con T4 (Gráfico 9A y B).

Se observó que la PN de T0 fue mayor en las plantas cultivadas a la intemperie respecto a las que se mantuvieron en invernáculo, con diferencias significativas, para ambas poblaciones. Los resultados obtenidos muestran que las plantas provenientes de Santiago del Estero cultivadas en invernáculo, tienen una mayor tasa de PN que sus pares de

Córdoba. Los controles de ambos orígenes cultivados a la intemperie se comportaron de manera similar, sin diferencias significativas entre ellos.

La aplicación de la DR produjo un descenso significativo en la PN respecto a T0 en ambos orígenes y ambientes.

Esto se relaciona con el descenso en el IV ya que el contenido de los pigmentos fotosintéticos disminuyó con la aplicación de la DR del herbicida a los 7 DPA. Las plantas más afectadas son las provenientes de Santiago del Estero cultivadas a la intemperie quienes registran los valores más bajos de PN (Gráfico 9A y B).

Tabla 9. Valores de probabilidad (P) obtenidos a partir de los correspondientes análisis de medias (ANOVA) sobre la Fotosíntesis neta (PN) según el efecto de la Población (Pobl.), ambiente de crecimiento (Ambiente), dosis de glifosato (Dosis) y las interacciones resultantes.

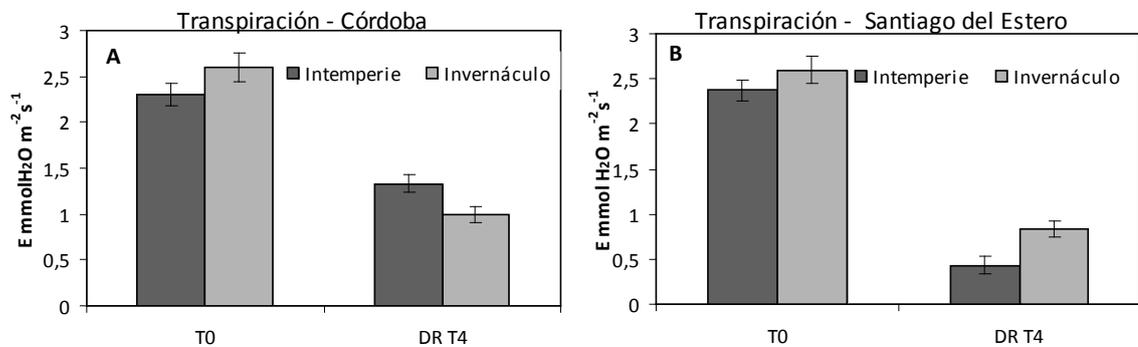
Fuente de variación	SC	GL	MS	F	P valor
Pobl	19,08	1	19,08	10,54	0,0051
Ambiente	63,37	1	63,37	34,99	≤ 0,001
Dosis	2079,48	1	2079,48	1148,35	≤ 0,001
Pobl*Ambiente	71,41	1	71,41	39,43	≤ 0,001
Pobl*Dosis	85,88	1	85,88	47,42	≤ 0,001
Ambiente*Dosis	165,37	1	165,37	91,32	≤ 0,001
Pobl*Amb*Dosis	12,61	1	12,61	6,97	0,0178

A partir del análisis de la varianza, no se detectó diferencias altamente significativas ($p < 0.01$) en la interacción triple entre población, ambiente y dosis para la PN.

Sin embargo, se observaron diferencias altamente significativas en las interacciones dobles población * ambiente, población * dosis y ambiente * dosis para la PN (Tabla 9).

3.3.2. Transpiración (E)

Gráfico 10. Transpiración (E) expresado en $\text{mmol H}_2\text{O m}^{-2}\text{seg}^{-1}$ en plantas provenientes de Córdoba cultivadas en invernáculo e intemperie (A) y de Santiago del Estero cultivadas en invernáculo e intemperie (B).



Las mediciones se registraron en los tratamientos T0 (control sin aplicación) y T4 (1440 gea: dosis recomendada) a los 7 días post-aplicación del herbicida (DPA).

Los controles de ambos orígenes y ambientes de crecimiento, mostraron los mayores registros de E comparados con T4.

Se observaron los mayores valores de E en las plantas T0 cultivadas en invernáculo respecto a las que se mantuvieron a la intemperie, aunque sin diferencias significativas en ambos orígenes y situaciones de crecimiento.

La aplicación de la DR de glifosato produjo una disminución significativa en los valores de E en ambos orígenes. El menor registro se observó en las plantas de Santiago del Estero cultivadas a la intemperie sin diferencias significativas respecto a sus pares cultivadas en invernáculo (Gráfico 10A y B).

Se observaron diferencias significativas con las plantas provenientes de Córdoba cultivadas a la intemperie que registraron el mayor valor de E.

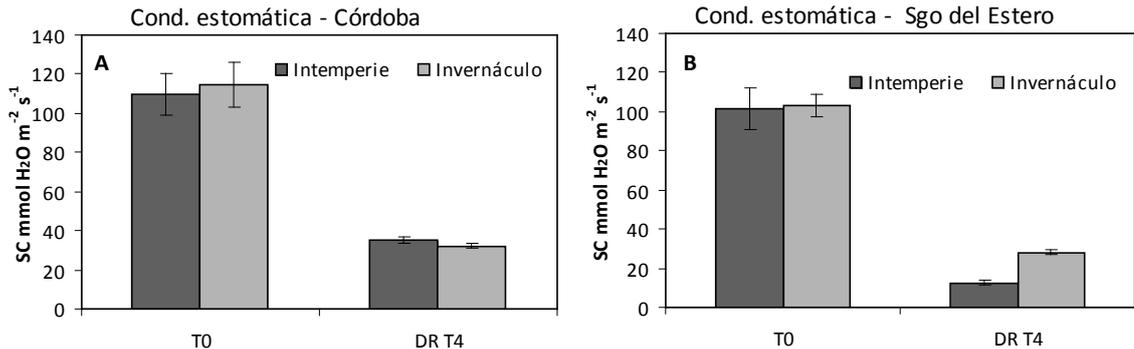
Tabla 10. Valores de probabilidad (P) obtenidos a partir de los correspondientes análisis de medias (ANOVA) sobre la Transpiración (E) según el efecto de la Población (Pobl), ambiente de crecimiento (Ambiente), dosis de glifosato (Dosis) y las interacciones resultantes.

Fuente de variación	SC	GL	MS	F	P valor
Pobl	0,375	1	0,375	7,438	0,0149
Ambiente	0,135	1	0,135	2,678	0,1213
Dosis	14,726	1	14,726	292,099	≤ 0,001
Pobl*Ambiente	0,166	1	0,166	3,306	0,0878
Pobl*Dosis	0,482	1	0,481	9,554	0,0070
Ambiente*Dosis	0,082	1	0,081	1,620	0,2213
Pobl*Amb*Dosis	0,240	1	0,240	4,760	0,0443

A partir del análisis de la varianza, no se detectó diferencias altamente significativas ($p < 0.01$) en la interacción triple entre población, lugar de crecimiento y dosis para el parámetro E (Tabla 10).

3.3.3. Conductancia Estomática (CS)

Gráfico 11. Conductancia Estomática (SC) expresado en $\text{mmol H}_2\text{O m}^{-2}\text{seg}^{-1}$ en plantas provenientes de Córdoba cultivadas en invernáculo e intemperie (A) y de Santiago del Estero cultivadas en invernáculo e intemperie (B).



Las mediciones se registraron en los tratamientos T0 (control) y T4 (1440 gea: dosis recomendada) a los 7 DPA del herbicida.

La aplicación de la DR produjo un cierre estomático que se acentúa en las plantas de Santiago del Estero cultivadas a la intemperie que se diferencian significativamente de aquellas cultivadas en invernáculo (Gráfico 11 B).

Las plantas T4 de Córdoba registraron disminución en los valores de CS, pero éstos son más altos que los de sus pares de Santiago del Estero (Gráfico 11 A).

Los mayores registros de CS se observaron en las plantas T0 de Córdoba vs. Santiago del Estero. De éstas últimas, las que crecieron a la intemperie, manifestaron un cierre estomático acentuado ante la aplicación de la DR del herbicida 7 DPA.

Tabla 11. Valores de probabilidad (P) obtenidos a partir de los correspondientes análisis de medias (ANOVA) sobre la Conductancia Estomática (CS) según el efecto de la Población (Pobl.), ambiente de crecimiento (Ambiente), Dosis de glifosato (Dosis) y las interacciones resultantes.

Fuente de variación	SC	GL	MS	F	P valor
Pobl	810,8	1	810,8	51,312	≤ 0,001
Ambiente	133,0	1	133,0	8,417	0,0104
Dosis	38520,1	1	38520,1	2437,659	≤ 0,001
Pobl*Ambiente	78,8	1	78,8	4,989	0,0401
Pobl*Dosis	21,1	1	21,1	1,335	0,2649
Ambiente*Dosis	12,8	1	12,8	0,808	0,3822
Pobl*Amb*Dosis	184,3	1	184,3	11,661	0,0035

A partir del análisis de la varianza, se detectó diferencias altamente significativas ($p < 0.01$) en la interacción triple entre población, lugar de crecimiento y dosis aplicada para el parámetro CS.

El parámetro CS no mostró diferencia altamente significativa para las interacciones dobles población*ambiente, población*dosis y ambiente*dosis (Tabla 11).

3.4. Supervivencia de plántulas (SP)

A los 15 DPA se procedió a realizar el recuento de las plantas controladas por las distintas dosis de glifosato aplicadas. Fueron realizadas observaciones visuales y fotográficas de los daños observados en hojas y tejidos aéreos con evidente clorosis y/o necrosis y senescencia avanzada.

La población proveniente de Santiago del Estero mostró los mayores daños en la parte aérea respecto de sus pares cordobesas, siendo la dosis más elevada (T6) la que produjo diferencias significativas entre los orígenes.

Gráfico 12. Dosis de inhibición media (I50) de Supervivencia (%PS) de plantas de Córdoba y Santiago del Estero cultivadas en invernáculo e intemperie a los 15 DPA del glifosato.

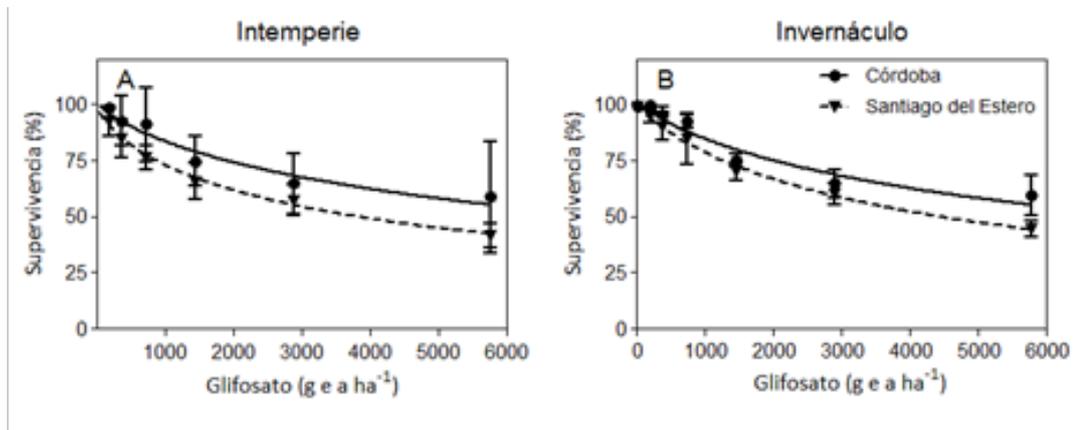


Tabla 12 Valores de probabilidad (P) y R^2 obtenidos del análisis de regresión de la Supervivencia de Plántulas (SP) según la Población (C y SE) y Lugar de crecimiento (intem. e inv.) a los 15 Días Post-aplicación (DPA) de glifosato.

	C (%)	D (%)	I50 (g ea ha-1)	b	P	R2
C intem	0	101	7309	0,78	<0,01	0,88
C inv	0	102	7069	0,87	<0,01	0,89
SE intem	0	99	3834	0,74	<0,01	0,92
SE inv	0	100	4417	0,80	<0,01	0,93

A los 15 DPA se observó que la supervivencia de las plantas (%PS) se ajustaron al modelo de Streibig y Kudsk, (1993). Según la prueba de F el parámetro I50 (Dosis de inhibición media) de ambas poblaciones fue significativamente diferente.

Los valores obtenidos indican que la población de Córdoba presenta un I50 mayor respecto a Santiago del Estero. En esta última población la disminución fue más acentuada en aquellas plantas cultivadas a la Intemperie

3.4.1. SP provenientes de Córdoba

En dicha población, a los 15 DPA, por debajo de la DR se registró una elevada tasa de supervivencia con pocos síntomas visibles de daño en las hojas, manifestado como clorosis.

Las plantas de T5 registraron clorosis y necrosis en amplias zonas de la parte aérea. La yema apical en la totalidad de las plantas presentó necrosis y se observó actividad de las yemas axilares basales con crecimiento de ramificaciones laterales. Esto indicó que el herbicida indujo la ruptura de la dominancia apical y, consecuentemente, se intensificó la actividad de las yemas laterales ubicadas en la base de las plantas (Lámina 4, Imagen C y D).

Las plantas correspondientes a T6 también presentaron la yema apical y amplias zonas de las hojas apicales necrosadas. La dominancia apical se vio afectada y se registró crecimiento de yemas axilares basales (Lámina 4, Imagen C y D).

Este comportamiento se registró en las plantas cultivadas en invernáculo y a la intemperie.

3.4.2. SP provenientes de Santiago del Estero

Estas plantas no vieron afectada su supervivencia a las mínimas dosis de glifosato (T1, T2 y T3) respecto al control (T0).

La DR registró síntomas visibles de clorosis en amplias zonas de las hojas con la muerte de la yema apical. Se evidenció la actividad de numerosas yemas axilares basales. Esta tendencia se observó en las plantas cultivadas en invernáculo e intemperie, coincidiendo con lo observado en las plantas de Córdoba T5 y T6 (Lámina 5, Imagen B, E y F).

Las plantas tratadas con las dosis más elevadas (T5 y T6) mostraron una acentuada necrosis del tejido aéreo y muerte de la yema apical visualizándose rebrote de las yemas

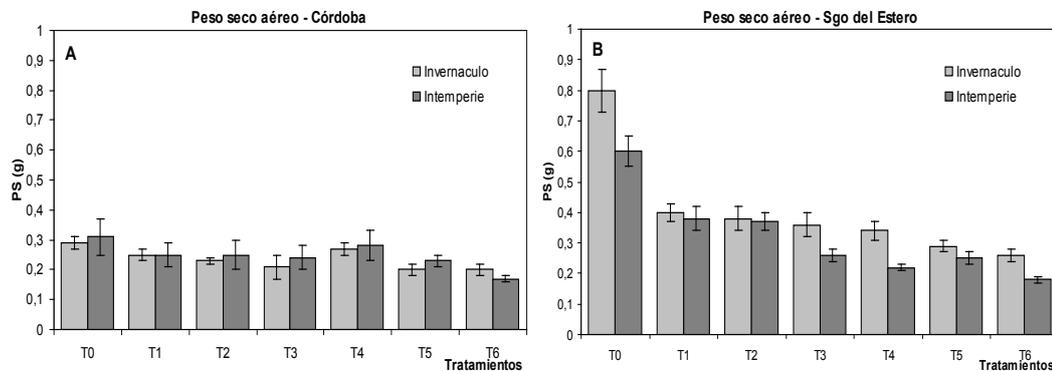
axilares basales. Las plantas de T6 son las que manifestaron los mayores síntomas de daño respecto al resto de los tratamientos evaluados (Lámina 5, imagen B, G, H, I y J).

Los síntomas se manifestaron como clorosis acentuada, necrosis y muerte de la yema apical pero no indicó la muerte de los individuos ya que se registró actividad de las yemas axilares ubicadas en la base de las plantas. Estas dosis tuvieron efectos notorios manifestados visualmente pero no ejerció un evidente control de las poblaciones.

3.5. Determinación de peso seco (PS) a los 30 días PA del herbicida.

3.5.1. Peso seco aéreo (PSA)

Gráfico 13. Peso seco aéreo (PSA) en plantas de Córdoba cultivadas en invernáculo e intemperie (A) y de Santiago del Estero cultivadas en invernáculo e intemperie (B).



Las mediciones se registraron a los 30 DPA. Los T realizados son: T0 (control, sin aplicación), T1 (180 meq. ácido), T2 (360 meq. ácido), T3 (720 meq. ácido), T4 (1440 meq. ácido), T5 (2880 meq. ácido) y T6 (5760 meq. ácido).

3.5.1.1. Población proveniente de Córdoba

Las diferencias significativas en este parámetro fueron registradas entre T0 y T4 versus T5 y T6, quienes acumularon menor materia seca y coinciden con los T que recibieron las mayores dosis de glifosato aplicado que afectaron el crecimiento foliar.

Las aplicaciones de las dosis más bajas de glifosato, e incluso la recomendada, no redujeron la acumulación de PSA.

3.5.1.2. Población proveniente de Santiago del Estero

Las plantas cultivadas en invernáculo registraron mayor acumulación de PSA en todos los T evaluados. Se registraron diferencias significativas entre ambas condiciones de crecimiento en T0, T3, T4 y T6.

Los controles registraron acumulación de PSA con valores significativamente más elevados que el resto de los T realizados.

Se comprobó que las plantas provenientes de Santiago del Estero vieron afectada la acumulación de PSA cuando fueron tratadas con las diferentes dosis del herbicida, si bien los registros son más altos que los de sus pares de Córdoba.

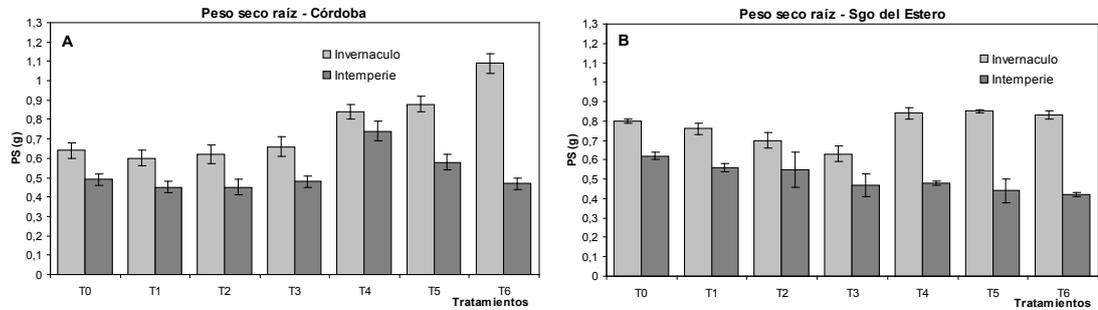
Tabla 13. Valores de probabilidad (P) obtenidos a partir de los correspondientes análisis de medias (ANOVA) sobre el Peso seco aéreo (PSA) según el efecto de la Población (Pobl), Ambiente de crecimiento (ambiente), Dosis de glifosato (Dosis) y las interacciones resultantes.

Fuente de variación	SS	GL	MS	F	P valor
Pobl	2,506	1	2,506	11895	$\leq 0,001$
Ambiente	0,682	1	0,682	3238	$\leq 0,001$
Dosis	0,681	6	0,113	538,8	$\leq 0,001$
Pobl*Ambiente	0,240	1	0,240	1139	$\leq 0,001$
Pobl*Dosis	0,417	6	0,070	330,6	$\leq 0,001$
Ambiente*Dosis	2,315	6	0,385	1831,1	$\leq 0,001$
Pobl*Amb*Dosis	1,342	6	0,224	1061,4	$\leq 0,001$

A partir del análisis de la varianza, se detectó diferencias altamente significativas ($p < 0.01$) en la interacción triple entre población, ambiente de crecimiento y dosis para el parámetro PSA.

3.5.2. Peso seco radicular (PSR)

Gráfico 14. Peso seco radicular (PSR) en plantas de Córdoba cultivadas en invernáculo e intemperie (A) y de Santiago del Estero cultivadas en invernáculo e intemperie (B).



Las mediciones se registraron a los 30 DPA. Los T realizados son: T0 (control, sin aplicación), T1 (180 meq. ácido), T2 (360 meq. ácido), T3 (720 meq. ácido), T4 (1440 meq. ácido), T5 (2880 meq. ácido) y T6 (5760 meq. ácido).

3.5.2.1. Población proveniente de Córdoba

La mayor acumulación de PSR se observó en las plantas cultivadas en invernáculo en todos los T realizados con diferencias estadísticamente significativas respecto de las cultivadas a la intemperie.

Los mayores registros se dieron en T4, T5 y T6 de las plantas cultivadas en invernáculo con diferencias significativas respecto a T0, T1, T2 Y T3 (Gráfico 14A). Las plantas de T1, T2 Y T3 cultivadas a la intemperie no presentaron diferencias significativas en la acumulación de PSR respecto a T0 cultivado en la misma situación de crecimiento.

3.5.2.2. Población proveniente de Santiago del Estero

Las plantas cultivadas en invernáculo registraron mayor acumulación de PSR en todos los T respecto a sus pares cultivadas a la intemperie.

Las plantas de T4, T5 y T6 cultivados en invernáculo registraron mayores niveles de PSR que el control (T0) y que T1, T2 y T3, con diferencias significativas.

Las plantas cultivadas a la intemperie tuvieron menor acumulación de PSR con valores que fueron descendiendo a medida que aumentaba la dosis aplicada del herbicida (Gráfico 14B).

Esta menor acumulación de PSR en las plantas que recibieron las dosis más elevadas del herbicida podría indicar una removilización de asimilados desde la raíz hacia las yemas de la base del xilopodio que se encuentran en actividad.

Los tratamientos con las diferentes dosis de herbicida produjeron descenso de la acumulación de PSR sin significancia estadística (Gráfico 14B).

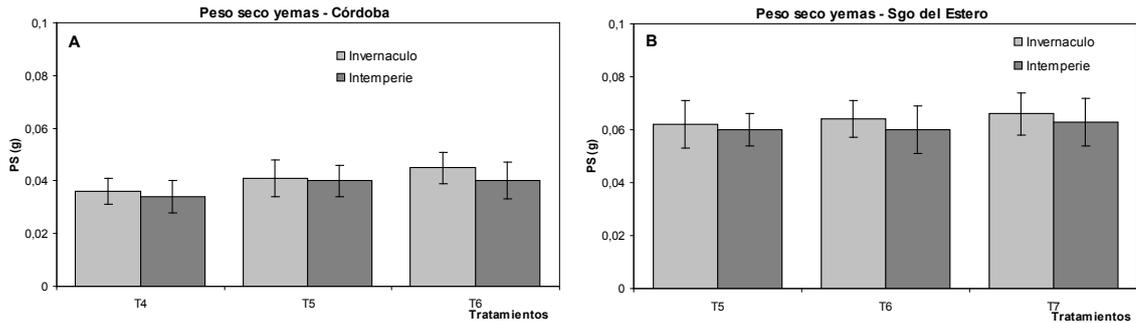
Tabla 14. Valores de probabilidad (P) obtenidos a partir de los correspondientes análisis de medias (ANOVA) sobre el Peso seco radicular (PSR) según el efecto de la Población (Pobl), Ambiente de crecimiento (ambiente), Dosis de glifosato (Dosis) y las interacciones resultantes.

Fuente de variación	SS	GL	MS	F	P valor
Pobl	0,682	1	0,682	3237,6	≤ 0,001
Ambiente	2,506	1	2,506	11895	≤ 0,001
Dosis	0,681	6	0,113	538,8	≤ 0,001
Pobl*Ambiente	0,240	1	0,240	1139	≤ 0,001
Pobl*Dosis	0,418	6	0,697	330,6	≤ 0,001
Ambiente*Dosis	2,315	6	0,385	1831	≤ 0,001
Pobl*Amb*Dosis	1,342	6	0,224	1061,4	≤ 0,001

A partir del análisis de la varianza, se detectó diferencias altamente significativas en la interacción triple entre población, ambiente de crecimiento y dosis para el parámetro PSR (Tabla 14).

3.5.3. Peso seco de las yemas activas ubicadas en el cuello de las plantas (PSY)

Gráfico 15. Peso seco de yemas activas (PSY) en plantas de Córdoba cultivadas en invernáculo e intemperie (A) y de Santiago del Estero cultivadas en invernáculo e intemperie (B).



Las mediciones se registraron a los 30 DPA. Los T evaluados son: T4 (1440 meq. ácido), T5 (2880 meq. ácido) y T6 (5760 meq. ácido).

Fue observado rebrote de yemas en el cuello de las plantas de ambos orígenes y ambientes de crecimiento en T4, T5 y T6.

Se registraron diferencias estadísticamente significativas en el PSY de las plantas de Córdoba versus Santiago del Estero. Estas últimas presentaron yemas activas de mayor PS. Esto fue observado en las plantas cultivadas en ambos ambientes (Gráfico 15 A y B).

Las plantas cordobesas manifestaron rebrote de yemas sin diferencias significativas entre T4, T5 y T6 y ambientes (Lámina 4, Imagen I, J, K, L y M).

La misma tendencia fue observada en las plantas de Santiago del Estero pero con valores significativamente más altos de acumulación de PSY. (Lámina 5, Imagen F, H y J).

CAPÍTULO 4

DISCUSIÓN

4.1.1. Estudio morfo-anatómico de las hojas

Las hojas de *G. perennis* de los dos orígenes poseen en su superficie foliar una capa cuticular con depósitos de ceras epicuticulares que se disponen en forma de escamas y en algunas ocasiones en forma de discos (Lámina 2, Imagen D y E). Fank-do-Carvalho et al. (2010) informaron la presencia de una cutícula delgada y depósitos de ceras epicuticulares sobre la superficie foliar de cuatro especies de *Gomphrena* endémicas del bioma Cerrado de Brasil. Las ceras se comportarían como una barrera física a la penetración del herbicida, tal cual fue propuesto por Bukovac (1976).

La formación de la cutícula y el depósito de las ceras epicuticulares están asociados con el contenido de agua del suelo y la humedad relativa del aire. Baker (1974) observó que en *Brassica oleracea var. gemmifera* la disminución de la humedad relativa produjo incrementos en la deposición de ceras y modificó el tamaño, la configuración y la distribución de las mismas en las superficies foliares.

Existen numerosos estudios que afirman que el desarrollo de la cutícula está positivamente correlacionado con altas intensidades lumínicas. Juniper (1958) observó que la deposición de ceras epicuticulares en hojas de poroto se incrementó bajo altas intensidades lumínicas unas cinco veces. En 1955 Skoss sugirió que el incremento en la producción de ceras con elevadas intensidades lumínicas podría ser un indicador de zonas donde se producen episodios de estrés hídrico.

Mc Whorter y Azlin (1980) informaron que la absorción y el traslado del glifosato fue más efectivo en plantas de *Sorghum halepense* "sorgo de Alepo" que crecieron en atmósferas con 100% de humedad relativa (HR) respecto aquellas que crecieron en atmósferas con 45 % HR. Estos autores informaron que la absorción se incrementó cuando la temperatura del aire subió de 24 a 35 °C y cuando la humedad del suelo se incrementó de un 12% (cerca al punto de marchitez) a un 20% (capacidad de campo).

Asimismo, Ahmadi et al. (1980) reportaron incrementos en la absorción de glifosato en plantas de sorgo de Alepo desde 20% en suelos con baja disponibilidad de agua (-3,7 bares) a 62% en suelos con buena disponibilidad hídrica (-0,25 bares).

Algunos investigadores sugieren que son los teicodes los que funcionan como vías de paso de las ceras y la cutina que se sintetizan en las células epidérmicas hacia la superficie a través de las paredes celulares (Baker, 1982; Lyshede, 1982; Anton et al, 1994). Aunque se han detectado poros y canales en las cutículas de hojas y frutos de numerosas especies, parece que estas estructuras no están difundidas en todos los órganos vegetales (Lyshede, 1982; Miller, 1985, 1986). Es de suponer entonces que la presencia de estas estructuras podría significar una barrera física para la normal absorción del glifosato.

La superficie foliar de las plantas provenientes de Santiago del Estero poseen mayor número de tricomas por unidad de superficie que las plantas procedentes de Córdoba. Esto se registra en ambas superficies y además, los tricomas de las plantas santiagueñas son de mayor longitud y con mayor número de células que las provenientes de Córdoba. (Lámina 1, Imagen C y D).

La presencia de tricomas en ambas caras, coincide con lo observado por García et al (2008) en *Gomphrena albiflora* Moq. Esta especie presenta una densidad de 23 ± 3 tricomas/mm² asociándose su presencia a mecanismos tendientes a evitar el sobrecalentamiento de la hoja y controlar la transpiración (Johnson, 1974; Ehleringer y Mooney, 1978).

En las hojas de ambas procedencias estudiadas en este trabajo se observa que la epidermis adaxial posee tricomas de menor longitud respecto a la cara abaxial, sin diferencias significativas. La presencia de tricomas más largos en la cara abaxial podría asociarse con mecanismos adaptativos tendientes a reducir la tasa transpiratoria de esta especie, que vive en regiones de clima cálido y seco como fue informado por Benzing y Renfrow (1971), Luttge et al. (1986) y Larcher (2003) en numerosas bromeliáceas y especies con metabolismo C₄.

Levin (1973) establece que los tricomas juegan un rol importante en la defensa vegetal, ya sea para contrarrestar el ataque de insectos fitófagos, o para complementar la defensa

química debido a la presencia de glándulas que exudan terpenos, fenoles, alcaloides u otras sustancias con acción repelente.

Es probable que la presencia de abundantes tricomas en la superficie foliar de *G. perennis* provea atributos de protección, además de morigerar el impacto de las condiciones ambientales severas, como fue observado por Luttge et al. (1986) y Larcher (2003) en otras especies de plantas.

Existen evidencias que los tricomas representan una barrera física para la normal penetración y/o absorción del herbicida aplicado, como fue determinado por Vila Aiub et al. (2012) en biotipos resistentes de *Sorghum halepense* y por Feng et al. (2004) en *Conyza canadensis*.

Existe información que demuestra que el control de malezas presentes en zonas áridas generalmente es más dificultoso que en las regiones húmedas, y ello se puede atribuir a una menor área foliar y a un incremento en la capa cuticular en condiciones secas (Dall'Armellina and Zimdahl, 1989). Estos antecedentes y la presencia de abundantes tricomas con teicodes asociados podrían explicar uno de los principales mecanismos de tolerancia que presenta *G. perennis* a la aplicación del glifosato.

Las hojas de *G. perennis* de ambas procedencias, poseen abundantes tricomas con teicodes asociados. (Lámina 1, Imagen C y D; Lámina 2, Imagen B). Estos resultados coinciden con lo observado por Fank-do-Carvalho et al. (2010) quienes estudiaron especies de *Gomphrena* endémicas del bioma del Cerrado en Brasil.

Las observaciones realizadas en este trabajo confirman la presencia de teicodes en la superficie de los tricomas de las hojas de *G. perennis* de ambas poblaciones. Estas estructuras constituyen una vía de secreción de ceras epicuticulares y cutina (Lyshede, 1982; Anton et al. 1994) que podrían interferir en la absorción de glifosato. Se podría inferir que los teicodes no sólo obstruyen la absorción del herbicida sino su normal traslado, impidiendo que el mismo pueda ejercer la acción fitotóxica.

Las hojas de *G. perennis* poseen estomas de tipo anomocítico tanto en la epidermis adaxial como en la abaxial coincidiendo con lo descrito por García et al. (2008) en *G. albiflora* que crece naturalmente en la zona costera del Estado Falcón (Venezuela) y por

Fank-do-Carvalho et al. (2010) en especies de *Gomphrena* endémicas del bioma Cerrado de Brasil.

La cara adaxial de las hojas procedentes de Córdoba poseen significativamente mayor número de estomas por mm² que la cara abaxial. Mientras que las hojas provenientes de Santiago del Estero registran menor densidad estomática en la cara adaxial por unidad de superficie, que sus pares cordobesas (Tabla 2). Esta menor densidad estomática observada en las plantas procedentes de Santiago del Estero indicaría un mecanismo adaptativo tendiente a reducir la pérdida de agua y minimizar la tasa transpiratoria en ambientes cálidos y de baja humedad relativa ambiental.

García et al. (2008) determinaron en hojas de *G. albiflora*, especie que crece naturalmente en la zona costera de Venezuela, mayor número de estomas/mm² en ambas superficies foliares (66±7). Fank-do-Carvalho et al. (2010) contabilizaron mayor densidad estomática en tres de las cuatro especies de *Gomphrena* endémicas estudiadas. Los resultados obtenidos por estos autores indican que *G. virgata* Mart. tiene una densidad estomática con valores cercanos a los registrados en el material estudiado en este trabajo.

4.1.2. Anatomía de la lámina foliar

Las hojas de *G. perennis* poseen estructura Kranz de tipo “atriplicoide”, coincidiendo con lo descrito para *Gomphrena globosa* L., que presenta estructura del tipo amarantaceae III (Atriplicoide) y *G. albiflora* Moq. (García et al. 2008).

Los haces vasculares se encuentran rodeados total o casi completamente por una vaina parenquimática amplia, que contiene abundantes cloroplastos ubicados en forma centrípeta. El mesófilo circundante se dispone de manera radiada y presenta cloroplastos más pequeños que los ubicados en las células de la vaina con posición centrípeta.

Entre los haces vasculares se observan células parenquimáticas incoloras de gran tamaño, algunas de las cuales contienen drusas.

Las drusas están constituidas por depósitos de compuestos inorgánicos, fundamentalmente sales de calcio y anhídridos silícicos, siendo la más común el oxalato

cálcico, que aparece en forma de sales mono o dihidratadas en muchas formas cristalinas (Prychid y Rudall, 1999).

Las funciones atribuidas al proceso de calcificación comprenden la eliminación de oxalato en aquellas plantas incapaces de metabolizarlo, protección contra los herbívoros (Molano-Flores, 2001), ser fuente de reserva de calcio (Volk et al, 2002), la desintoxicación de metales pesados (Nakata, 2003), la adición de potencia mecánica y peso al tejido vegetal (Cheavin 1938).

El recuento de drusas en las hojas de las plantas provenientes de Córdoba fue significativamente mayor que en las de Santiago del Estero ($31/\text{mm}^2$ vs. $20/\text{mm}^2$).

Estas drusas podrían constituir un mecanismo de almacenamiento y/o defensa ante las condiciones ambientales severas que se dan naturalmente en la zona de crecimiento de esta especie.

Las hojas de *G. perennis* de ambos orígenes poseen elevada densidad de venación siendo documentado por Esau (1977) que es una característica común de hojas xeromórficas, independientemente de su metabolismo fotosintético. La elevada densidad de venas es un carácter mejorador que favorece la supervivencia de las plantas en ambientes secos con alta irradiancia y humedad relativa baja como fue informado por Zalenski (1902) y Roth-Nebelsick et al (2001). La presencia de abundantes venas foliares le conferiría atributos para permitir la supervivencia en las zonas donde naturalmente crece *G. perennis*.

4.2. Efecto de la aplicación de glifosato sobre la fisiología de *Gomphrena perennis*

Una vez que el glifosato ingresa al mesófilo de las hojas se transporta por simplasto siguiendo el flujo de los fotoasimilados hasta acumularse en los órganos subterráneos, hojas jóvenes y meristemas que se encuentran en activo crecimiento (Weaver y Hermann, 1977; Martin y Edginton, 1981).

El sitio de acción del herbicida es la enzima EPSPS (5-enolpiruvil shikimato 3-fosfato sintasa), codificada en el núcleo celular y transportada al cloroplasto a través de un péptido de transporte donde participa en la ruta metabólica del AS. Luego de la inhibición

de la EPSPS se produce la deficiencia de intermediarios para el ciclo de Calvin, que permite la fijación de CO₂ para formar carbohidratos. De esta manera, se reducen los niveles de almidón y azúcares sintetizados en las hojas aplicadas. Se limita la carga y transporte por floema de la sacarosa y debido a que el glifosato se transporta conjuntamente con el disacárido proveniente de la fotosíntesis, el herbicida limita su propio transporte por la planta. Finalmente, la inhibición de la EPSPS afecta la síntesis de aminoácidos aromáticos que pueden afectar la síntesis de proteínas, pero esta no es la principal causa de los síntomas.

La inhibición de la ruta del AS produce la acumulación de este ácido (Pline et al. 2002b) y de ciertos ácidos hidroxibenzoicos tales como el gálico y protocatéquico en especies vegetales sensibles, afectando numerosos procesos fisiológicos (Cole, 1985).

Al inhibirse esta vía metabólica no se sintetiza triptofano, tirosina y fenilalanina, con la consecuente repercusión en el metabolismo proteico y en numerosos procesos metabólicos (Cole, 1985; Schonbrunn et al., 2002).

La reducción de la absorción y translocación de glifosato ha sido encontrada en *Lolium multiflorum* en Chile (Pérez y Kogan, 2003). Efectivamente, los biotipos resistentes de esta especie muestran una reducción en la absorción del herbicida y una concentración más elevada en la punta de las hojas (Michitte et al. 2007). También se ha registrado una reducción en la absorción y translocación del herbicida en *Lolium multiflorum* de USA (Nandula et al., 2008). La acumulación de glifosato en hojas tratadas ha sido también identificada en biotipos resistentes de *Conyza canadensis* (USA) y *Conyza bonariensis* en España y Brasil (Feng et al. 2004; Koger y Reddy, 2005; Dinelli et al., 2008). Las últimas investigaciones demuestran que la secuestación del herbicida en la vacuola es el mecanismo de resistencia en *C. canadiensis* (Ge et al. 2010). Lo anteriormente mencionado sugiere que aquellos biotipos resistentes a glifosato en los cuales se ha determinado reducida translocación, el herbicida es secuestrado en la vacuola.

Estudios realizados con técnicas de electroforesis capilar en biotipos susceptibles de *Amaranthus retroflexus* y resistentes de *Mucuna pruriens* tratados con glifosato, muestran que la especie resistente puede metabolizar más rápido y eficazmente el herbicida que la especie susceptible (Rojano-Delgado et al. 2012). Los resultados obtenidos por estos

autores muestran que 168 horas después de la aplicación de 500 g.e.a/Ha la especie tolerante metaboliza el herbicida a nuevos productos, como AMPA, glioxilato, sarcosina y formaldehído. Los resultados indican claramente que *M. pruriens* puede metabolizar el glifosato a productos no tóxicos (Rojano-Delgado et al. 2012).

Estos antecedentes condujeron a determinar los niveles de AS acumulado en los diferentes órganos de *G. perennis* para evaluar la movilización del herbicida dentro de la planta y la sensibilidad de los diferentes tejidos a la aplicación del herbicida.

El mayor nivel de AS se produjo a las 72 HPA y se registró aumentos en la acumulación a medida que incrementó la dosis de glifosato aplicado.

Los resultados fueron similares para ambas poblaciones.

4.2.1. Acumulación de Acido Shikímico (AS)

Diversos autores han demostrado que la acumulación de AS es diferencial entre poblaciones de distinta sensibilidad al glifosato (Yu et al.; 2009; Yanniccari et al., 2009; 2014).

En este trabajo se encontró que la acumulación de AS no se vió afectada por la variable ambiente en la cual crecieron las plantas.

Los mayores registros fueron observados con el doble y el cuádruple de la DR según marbete para *G. perennis*. Se observó una respuesta diferencial en la acumulación en los diferentes órganos estudiados siendo las R los que menores valores registraron, mientras que de los órganos aéreos evaluados, las HA mostraron niveles más elevados respecto a las HB.

Estos resultados coinciden con los obtenidos por Pline et al. (2002a), quienes informaron que las raíces contienen menores niveles de AS respecto a los cotiledones de plantas de algodón no resistentes a glifosato. Weaver y Hermann (1997) indicaron que los genes de la enzima EPSPS se expresan en tejidos meristemáticos y órganos en activo crecimiento, explicando los mayores registros medidos en dichos órganos.

Las HB de las plantas T0 de ambos orígenes, mostraron bajos niveles de AS, si bien sus registros fueron 3 y 7 veces más elevados que en las R de Córdoba y Santiago del Estero, respectivamente.

La aplicación de la DR incrementó el contenido de AS en las HB a las 48 y 72 HPA 4 veces en plantas de Córdoba y 5 a 7 veces en plantas de Santiago del Estero.

Por su parte, el contenido de AS en las HA de las plantas de Córdoba tratadas con la DR se incrementó unas 12 y 24 veces a las 48 y 72 HPA, respectivamente, respecto a los valores basales registrados en T0. Las plantas de Santiago del Estero registraron niveles de acumulación en las HA que se incrementaron 7 y 9 veces respectivamente, a las 48 y 72 HPA respecto a T0 sin aplicación del herbicida (Gráfico 6A y 6B).

El AS registrado en las HA manifestaron que las plantas provenientes de Córdoba fueron las que acumularon los mayores niveles pudiendo sugerir un patrón diferencial de susceptibilidad al glifosato respecto a las plantas de Santiago del Estero.

Se demuestra entonces que los mayores contenidos relativos de AS se observaron en las HA de ambos orígenes a las 72 HPA. Plantas de *Amaranthus hybridus* susceptibles al glifosato poseen una tasa de acumulación de AS 4 a 5 veces superior que otras especies tolerantes como *Clitoria ternatea* y *Neonotonia wightii* provenientes de Méjico y siendo los valores mayores a las 72 y 96 HPA de 500 g.e.a de glifosato (Cruz-Hipólito et al., 2009; 2011).

4.2.2. Índice de Verdor (IV)

Spencer et al. (2008), señalaron que el contenido de clorofila declina significativamente ante aplicaciones de glifosato en biotipos susceptibles y ha sido empleado como un indicador de los efectos fitotóxicos del glifosato y de otros principios activos (Fuchs et al., 2002; Yasuor et al., 2008). Campbell et al. (1976) indicaron que el glifosato podría ejercer daño directo sobre los cloroplastos y su funcionalidad.

La WSSA (1998) distingue la aparición de los primeros síntomas cloróticos a los 4-7 DPA en especies de alta susceptibilidad al glifosato y a partir de los 10 días en aquellas menos susceptibles.

El efecto del herbicida se refleja en primer lugar, en hojas jóvenes y puntos de crecimiento (Herbicide Handbook, 1994).

De acuerdo a los resultados obtenidos en este trabajo, se comprobó que *G. perennis* se comporta como una planta susceptible a la aplicación de la DR de glifosato.

En la población de Córdoba, se evidenciaron diferencias significativas entre T0, T1, T2 y T3 a los 7 DPA. Mientras que fueron observadas diferencias significativas entre T0, T4, T5 y T6 desde los 2 DPA. Esta tendencia se acentuó con el transcurso de los días y los niveles de verdor disminuyeron en los tratamientos donde se efectuaron las aplicaciones de las mayores dosis de glifosato. La tendencia fue más acentuada en las plantas que se cultivaron en invernáculo respecto a las que crecieron a la intemperie. (Datos no mostrados).

Por su parte, la población santiagueña no evidenció diferencias significativas en el IV entre T0, T1 y T2 a los 3 y 7 DPA. Recién a los 10 DPA se registraron diferencias significativas entre el control y los T mencionados marcando una disminución acentuada del verdor. A los 7 DPA se registró una disminución del IV en T4, T5 y T6 respecto a T0. Las plantas cultivadas a la intemperie que registraron diferencias significativas respecto a T0 desde los 2 DPA del herbicida son las que corresponden a T3, T4, T5 y T6. Esta tendencia se mantuvo con el transcurrir de los días acentuándose la caída del verdor. Las plantas que crecieron a la intemperie manifestaron menores registros respecto a sus pares cultivadas en invernáculo. (Datos no mostrados).

A los 10 DPA la prueba de F para valores Spad demuestra que están definidas las diferencias entre los tratamientos evaluados. Se observa que tanto en invernáculo como a la intemperie la I50 de ambas poblaciones fue significativamente diferente ($P=0,02$).

Los valores obtenidos en este trabajo indican una mayor susceptibilidad al glifosato en la población de Santiago del Estero respecto a la de Córdoba creciendo en las mismas condiciones, coincidiendo con lo mencionado por Fuchs et al. (2002) y Yasour et al.

(2008). Dicha disminución se acentuó en las plantas cultivadas a la Intemperie respecto a las que se cultivaron en invernáculo.

Los resultados obtenidos en el presente trabajo coinciden con lo reportado por Zobiole et al. (2010) en plantas de soja resistentes al glifosato, quienes encontraron que los efectos inhibitorios del glifosato sobre el contenido de clorofila de las hojas no son inmediatos.

4.2.3. Determinación de parámetros metabólicos

Fotosíntesis Neta (PN)

El glifosato interviene en la disminución de los niveles de Ribulosa-1,5-bifosfato (R1,5-BPcarboxilasa) y de otros compuestos intermediarios en la ruta de la fijación del carbono. Esta pérdida puede deberse, en parte, a su movimiento dentro de la vía metabólica del ácido shikímico (Duke et al. 2003). Sin embargo, la fotosíntesis no parece ser el blanco primario de inhibición del glifosato aunque hay evidencias que este proceso metabólico es afectado por el herbicida (Madsen et al., 1995). El glifosato produce una rápida y continua disminución de la fijación de CO₂ en plantas susceptibles (Geiger et al., 1986; Díaz Vivancos et al.; 2011). Otros autores han informado que el cierre estomático es un factor determinante en la disminución de la asimilación de CO₂ (Zobiole et al., 2010).

Al analizar el efecto de la aplicación de glifosato no se detectó interacción triple entre población, ambiente y dosis para la PN mientras que se observaron interacciones dobles población * ambiente, población * dosis y ambiente * dosis para la PN.

El ambiente donde fueron cultivadas las plantas controles afectó la tasa de asimilación de CO₂ en ambas poblaciones. La mayor tasa de fijación se registró en las plantas cultivadas a la intemperie respecto a las que se mantuvieron en invernáculo, con diferencias significativas, para ambas poblaciones.

Los resultados obtenidos muestran que la población proveniente de Santiago del Estero cultivadas en invernáculo, tienen una mayor tasa de PN que las cordobesas cultivadas en esas mismas condiciones. Esto se podría atribuir a que las condiciones imperantes de

temperatura en el interior del invernáculo no produjeron un acentuado cierre estomático de las plantas santiagueñas, permitiéndole mantener una alta tasa de fijación de CO₂.

Los controles de ambas poblaciones cultivados a la intemperie se comportaron de manera similar, sin diferencias significativas entre ellos.

La asimilación de CO₂ registró un descenso significativo en las plantas tratadas con la dosis recomendada de glifosato (T4) respecto a T0, en ambas poblaciones y ambientes (Gráfico 9A y B). Estos resultados coinciden con lo mencionado por Geiger et al. (1986) y Díaz Vivancos et al. (2011). Los descensos más acentuados en la fijación de CO₂ se registraron en la población de Santiago del Estero cultivada a la intemperie, siendo éstas las plantas que registran el mayor cierre estomático. Zobiolo et al. (2010) atribuye al cierre estomático un rol determinante en la disminución de la asimilación de CO₂.

Asimismo, estos menores niveles de fijación de CO₂ se relacionan con el descenso en el IV ya que el contenido de los pigmentos fotosintéticos disminuyó con la aplicación del herbicida a los 7 DPA.

El descenso en el IV fue más acentuado en las plantas de Santiago del Estero que se comportó como más susceptible a la aplicación del herbicida respecto a sus pares provenientes de Córdoba (Gráfico 8A y B).

Transpiración (E)

Las plantas T0 de ambas poblaciones y ambientes de crecimiento manifestaron mayor E comparados con T4.

Las plantas no tratadas, en invernáculo registraron mayores niveles de E respecto a las que se mantuvieron a la intemperie, sin diferencias significativas en ambas poblaciones y situaciones de crecimiento. Esta respuesta es esperable ya que la temperatura y humedad relativa en el invernáculo son más elevados respecto a los que se registran fuera del invernadero y favorecen la pérdida de agua incrementando los niveles de E.

T4 produjo una reducción significativa de E en ambas poblaciones. El menor registro se observó en las plantas provenientes de Santiago del Estero que se cultivaron a la intemperie con diferencias significativas con el invernáculo (Gráfico 10A y B).

La menor E está asociada a la reducción en la fijación de CO₂, por la aplicación de T4, lo que coincide con el estudio de Zobiolo et al. (2010) También fueron observadas disminuciones significativas de E en las plantas de Córdoba en T4, sin embargo, los niveles de pérdida de vapor de H₂O son mayores respecto a las santiagueñas, siendo las cultivadas a la intemperie las que registraron el mayor valor.

Jordán (1977) evaluó el control de *Cynodon dactylon* con glifosato indicando que la toxicidad del herbicida se duplicó cuando la HR pasó de 40 a 100 %, independientemente del nivel de temperatura. La toxicidad fue mayor a 32 que a 22 °C cuando la HR era 40%, pero a 100% HR no se verificó efecto de la temperatura. Similares resultados fueron obtenidos por McWhorter y Azlin (1978) en sorgo de Alepo.

Nilsson y Hallgren (1989) informaron que el control de *Elytrigia repens* con glifosato fue más eficaz con HR de 90 % respecto a 55%, aunque la actividad a 90% se redujo si las plantas estaban húmedas por lluvia o rocío al momento de la aplicación. Si bien la tasa de absorción de glifosato está directamente relacionada con la HR, una vez absorbido, parte del herbicida se mueve en forma ascendente en el xilema y otra parte es descargada dentro del floema. Cranmer y Linscott (1990) informaron que cuando se aplicó una gota de solución concentrada de glifosato sobre una planta de *Abutilon theophrasti*, la toxicidad fue más alta a 45 que a 90% HR. Cuando la misma cantidad de herbicida se aplicó en varias gotas, ocurrió lo contrario. Gottrup et al. (1976) aplicaron una gota de glifosato por hoja, en varias hojas por planta de *Cirsium arvense* y *Euphorbia esula* determinando que la tasa de traslocación una semana posterior a la aplicación fue mucho más intensa con alta HR.

El conocimiento de la incidencia e interacción de estos factores climáticos es aun contradictorio, aunque resultan de suma importancia en el momento de la toma de decisión de la aplicación eficaz de glifosato para controlar las poblaciones problemáticas

Conductancia Estomática (Sc)

Zobiole et al. (2010) consideran que el cierre estomático inducido por la aplicación de glifosato podría ser un factor importante en la disminución de la fijación de CO₂. Los resultados obtenidos en el presente trabajo indican que en T4 se produjo un mayor cierre de estomas en ambas poblaciones y ambientes que en T0, coincidiendo con lo observado por Yannicari (2014) en plantas de *Lolium perenne* L. susceptibles tratadas con la dosis recomendada de glifosato. La disminución en los valores de Sc se produce a los 7 DPA del herbicida en plantas susceptibles. El cierre estomático se acentuó en las plantas de Santiago del Estero a la intemperie en comparación con el invernáculo (Gráfico 11 B). Estos resultados se relacionan con las respuestas observadas en la PN ya que las plantas santiagueñas a la intemperie tuvieron menor tasa de fijación de CO₂ respecto a las de invernáculo.

Las plantas de Córdoba tratadas con T4 registraron disminución en los valores de Sc, pero éstos son más altos que en plantas de Santiago del Estero (Gráfico 11 A).

La menor Sc que registraron las plantas de Santiago del Estero se puede atribuir a la adaptación a condiciones naturales de alta irradiancia y temperatura, y a la constitución morfo-anatómica de sus hojas que presentan tricomas de mayor longitud y en mayor abundancia por unidad de superficie. Carrasco-Ríos (2009) informa que las plantas presentan distintos mecanismos de adaptación a altas irradiancias que se relacionan con estrategias para reducir el exceso de luz. Dichas estrategias involucran la reducción del crecimiento, presencia de pelos y tricomas y aumento en el contenido de ceras que favorecen la reflexión de la luz. Benzing y Renfrow (1971), Luttge et al. (1986) y Larcher (2003) informaron que altas densidades de tricomas en la superficie de las hojas actúan como un filtro difusivo que refleja parte de la luz incidente y disminuye el efecto estresante de la elevada radiación solar.

4.2.4. Supervivencia de plántulas (SP)

Las observaciones visuales y fotográficas realizadas a los 15 DPA demuestra que la población de Santiago del Estero mostró los mayores síntomas de daño (clorosis y

necrosis) en las HA comparada con la de Córdoba del mismo tratamiento (Lámina 4, Imagen A; Lámina 5, Imagen A).

La Dosis de inhibición media (I50) de ambas poblaciones fue significativamente diferente ($P=0,02$) ya que los valores obtenidos indicaron que la población de Córdoba presenta un I50 mayor respecto a Santiago del Estero.,

A los 30 DPA del glifosato se acentuaron los efectos del herbicida en las dos poblaciones y ambientes. (Lámina 4, Imagen C y D; Lámina 5, Imagen B).

Las plantas de T1 y T2 que a los 15 DPA no habían manifestado daños, a los 30 DPA mostraron clorosis en las HA de ambas poblaciones (Lámina 4, Imagen B; Lámina 5, Imagen B).

En T4 no se acentuó la fitotóxicidad sino que se registró rebrote en las plantas sobrevivientes debido a la intensa actividad de las yemas axilares en la base del xilopodio (Lámina 4, Imagen H, I; J; Lámina 5, Imagen E y F).

Este fenómeno se registró en ambas poblaciones y ambientes constatándose la aparición de nuevas ramificaciones aéreas producto de la ruptura de la dominancia apical. La actividad de estas yemas basales se observó también en T5 y T6 de ambas poblaciones y ambientes de crecimiento evaluadas (Gráfico 12 A y B) (Lámina 4, Imagen K,L, M, N; Lámina 5, Imagen G,H,I,J).

El daño foliar provocado por las elevadas dosis de glifosato podría afectar el movimiento del herbicida hacia los órganos subterráneos, que se vería reflejado en un rebrote vigoroso de las yemas axilares ubicadas en el xilopodio. Lorraine-Colwill et al. (2003) indicaron que el glifosato presenta el fenómeno de autolimitación del traslado, condicionando una reducción del proceso de transporte debido a la toxicidad provocada en la planta. Estos resultados concuerdan con las observaciones realizadas por Yannicari et al. (2009; 2012; 2014) en poblaciones resistentes de *Lolium perenne* que presentaron rebrote de yemas axilares luego de ser tratadas con dosis elevadas de glifosato.

Este rebrote es considerado un nuevo tipo de resistencia denominado tipo fénix (Gressel, 2009), que se atribuye a mecanismos de relacionados a un transporte diferencial de

glifosato como también a un incremento de 2 a 3 veces en los niveles de expresión de la EPSPS (Dinelli et al., 2006; Dinelli et al., 2008).

Valverde et al. (2000) informaron que la aplicación de menores dosis a la recomendada de glifosato no produjo efectos sobre el rebrote de las yemas de *Echinochloa colona*, quienes vieron reducida su actividad, pues se favoreció el traslado del herbicida a la zona apical en activo crecimiento. En nuestro trabajo, no se observó actividad de las yemas axilares basales en las plantas tratadas con las dosis de glifosato menores a la recomendada, coincidiendo en parte con lo observado por dicho autor.

Existen evidencias de plantas de *Sorghum halepense* que han manifestado rebrote luego de la aplicación con la dosis recomendada de glifosato en biotipos de la provincia de Salta (Argentina) resistentes al herbicida (Valverde y Gressel, 2006).

Se puede afirmar que en *G. perennis* las dosis que dupliquen y cuadruplican la recomendada de glifosato altera los tejidos de conducción lo que afectaría el traslado del herbicida hacia los órganos subterráneos, reflejándose posteriormente en un vigoroso rebrote.

4.2.5. Peso seco (PS)

4.2.5.1. Peso seco aéreo (PSA).

En las plantas de Córdoba se determinó mayor PS en T0, con valores que no difieren significativamente de las menores dosis del herbicida e incluso de la DR. Las dosis aplicadas en T5 y T6 produjeron una reducción significativa respecto a T0.

En conclusión, las aplicaciones de las dosis más bajas de glifosato incluyendo la recomendada no redujeron el PSA, con igual comportamiento en ambos ambientes.

El PSA de las plantas de Santiago del Estero cultivadas en invernáculo fue significativamente mayor para las dosis T0, T3, T4 y T6 respecto a las cultivadas a la intemperie, siendo especialmente alto en T0.

Las plantas de Santiago del Estero registraron un PSA que triplicó al de las plantas de Córdoba (Gráfico 13A y B). La aplicación de T1, T2 y T3 redujo el PSA, si bien los registros son más altos que los de Córdoba.

La DR redujo significativamente PSA en intemperie respecto al invernáculo (Gráfico 13B) y en T5 y T6 se observó un PSA muy bajo especialmente en intemperie.

En el presente trabajo los resultados obtenidos indican que la aplicación de las mayores dosis de glifosato evaluadas produjo una disminución en la acumulación de PSA en los órganos aéreos que fueron los destinos más afectados.

Devine y Hall, (1990) informaron que el transporte sistémico del glifosato depende directamente de la producción de sacarosa en los órganos fuente donde los fotoasimilados son cargados al floema. Yannicari (2014) trabajando con biotipos susceptibles a glifosato de *Lolium perenne* informó la auto-limitación del transporte del herbicida causado por la inhibición en el movimiento de asimilados en los órganos fuente. En coincidencia, los resultados obtenidos en el presente trabajo indican que los efectos del glifosato sobre su auto-limitación del transporte se deben a la inhibición en el movimiento de asimilados en los órganos apicales de ambas poblaciones de *G. perennis* tratadas con las dosis más elevadas del herbicida.

4.2.5.2. Peso seco radicular (PSR)

Las plantas de ambos orígenes cultivadas en invernáculo, registraron mayor PSR en todos los T, con incrementos significativos en T4, T5 y T6 respecto a T0 (Gráfico 14 A y B).

La aplicación de la DR en las plantas cultivadas a la intemperie tuvieron mayor PSR que T0 probablemente debido a que se produjo movilización de asimilados hacia la zona radicular. Esta respuesta podría atribuirse a un comportamiento de reserva de asimilados que luego puedan dirigirse a las yemas basales ubicadas en el cuello del xilopodio como mecanismo de supervivencia ante condiciones desfavorables.

Se ha observado que ciertas especies modifican la partición de carbono como reserva y exportación hacia otros destinos (Wardlaw, 1990). Los resultados observados en este

trabajo indican que el glifosato reduce el traslado de asimilados hacia los órganos aéreos intensificando la acumulación en la zona subterránea afectando en consecuencia el patrón de exportación en las plantas de *G. perennis*.

Si bien esta respuesta se observó en todas las plantas, la acumulación de PSR fue mayor a la intemperie pudiendo atribuirse a las condiciones ambientales que pone en evidencia mecanismos de supervivencia respecto a las plantas que crecen en condiciones controladas.

Las plantas de Santiago del Estero cultivadas a la intemperie tuvieron menor acumulación de MSR respecto a las cultivadas en invernáculo, con valores que fueron descendiendo a medida que se aumentó la dosis aplicada (Gráfico 14B).

Esta menor acumulación de MSR en las plantas que recibieron las dosis más elevadas del herbicida indicaría una re-movilización de asimilados desde la raíz hacia las yemas ubicadas en la base del xilopodio que se encuentran en actividad. En efecto, las plantas de estos T registraron mayor acumulación de MSR indicando una re-movilización de reservas hacia esos órganos en activo crecimiento (Gráfico 15 B).

Los resultados obtenidos en este trabajo confirman que la aplicación de dosis elevadas de glifosato en plántulas de *G. perennis* modifica el patrón de distribución de asimilados, quienes se acumulan en los órganos subterráneos que presentan numerosas yemas que entran en actividad registrándose un vigoroso rebrote.

Estos resultados coinciden con lo observado por Nisensohn et al. (2007a) en la provincia de Santa Fe y por Cortés y Venier (2012) en la provincia de Córdoba en lotes de producción con poblaciones naturales de *G. perennis*.

4.2.5.3. Peso seco en las yemas activas ubicadas en el cuello de las plantas (PSY).

El rebrote a partir de las yemas basales se observó en ambas poblaciones y ambientes de crecimiento en T4, T5 y T6.

Las plantas de Santiago del Estero presentaron mayor PSY en ambos ambientes (Gráfico 15 A y B).

Estos resultados concuerdan con lo observado por Valverde y Gressel (2006) en biotipos de sorgo de Alepo que han manifestado rebrote luego de la aplicación con la dosis recomendada de glifosato en la provincia de Salta (Argentina) determinándose que las mismas son resistentes al herbicida.

En este trabajo se observó mayor PSY en la población santiagueña respecto a la cordobesa. Esto podría atribuirse a que la primera región presenta un período menor de presión de selección con glifosato que sumado a las variables ambientales y de manejo podrían ser condicionantes de diferentes mecanismos y respuesta a la tolerancia frente al herbicida.

CAPITULO 5

CONCLUSIONES

En este trabajo se comprobó que las poblaciones de *G. perennis* evaluadas son tolerantes a glifosato, lo que coincide con las observaciones realizadas por Pagani (com. pers.) y por Cortés y Venier (2012) en lotes de producción de las provincias de Santiago del Estero y Córdoba, respectivamente.

Si bien las dos poblaciones analizadas manifestaron similar comportamiento, las que proceden de Santiago del Estero mostraron una mayor sensibilidad a la dosis recomendada del herbicida respecto a las de Córdoba.

Los estudios de la superficie foliar indican que *G. perennis* posee características morfológicas como hojas con escasa superficie foliar, con ceras epicuticulares, y abundantes tricomas que son caracteres que reducen la eficacia del glifosato ya que se comportarían como barreras físicas o mecánicas que podrían explicar la tolerancia de esta maleza al herbicida. Las plantas de Santiago del Estero poseen mayor densidad de tricomas que las de Córdoba. En cambio, las de Córdoba tienen mayor cantidad de drusas que las santiagueñas. Esta variación intraespecífica está posiblemente asociada a los factores climáticos y ambientales en los cuales crecen estas poblaciones y pueden explicar la mayor susceptibilidad de las plantas de Santiago del Estero respecto a las de Córdoba.

La población de Santiago del Estero es más susceptible a la dosis recomendada de glifosato lo que se manifestó por la clorosis y necrosis en las hojas apicales a partir de los 2 DPA. Las plantas de Córdoba también manifestaron esos síntomas con menor severidad y luego de mayor cantidad de días después de la aplicación.

Ambas poblaciones manifestaron ruptura de la dominancia apical cuando se aplicó la dosis recomendada del herbicida y superiores. Esta respuesta trajo aparejado que entraran en actividad las yemas basales del xilopodio causando rebrote y aparición de nuevas ramificaciones aéreas. Es de suponer que este proceso sería causado por la alteración en

el modelo del traslado de asimilados y del herbicida modificando los destinos hacia los órganos subterráneos.

A la semana de la aplicación de la dosis recomendada del herbicida se observó reducción en la tasa de fijación de CO₂, en la transpiración y conductancia estomática en ambas poblaciones. Dicha disminución fue más acentuada en la población santiagueña evidenciando mayor sensibilidad a la aplicación del herbicida.

El metabolismo de fijación de CO₂ presente en *G. perennis* es de tipo C4, lo que le proporciona a esta especie una elevada tasa de elaboración y traslado de fotoasimilados por unidad de superficie y de tiempo. Esta propiedad le confiere una elevada tasa de crecimiento y re-movilización de reservas a los órganos en activo crecimiento, fundamentalmente las raíces en los estadios iniciales de implantación lo que también contribuye a explicar la mayor susceptibilidad de las plantas de Santiago del Estero.

Las áreas de crecimiento natural de esta especie son fundamentalmente templado cálidas, con alta irradiancia y temperatura media, y bajos niveles de humedad relativa atmosférica y edáfica. Estas características ambientales generan respuestas adaptativas en la superficie foliar que se acentúan si las condiciones son más severas. Esto se pone de manifiesto en las plantas de Santiago del Estero, donde el glifosato se comenzó a utilizar en forma generalizada en el cultivo de soja más tardíamente respecto a Córdoba.

Resulta importante señalar que para dilucidar con mayor exactitud los mecanismos imperantes en la tolerancia que manifiesta esta especie al glifosato será necesario indagar en:

- los caracteres morfo-anatómicos de sus órganos subterráneos,
- la dinámica del crecimiento inicial de las plántulas,
- la movilización de los asimilados y la cantidad y constitución de las ceras epicuticulares que se depositan sobre la superficie foliar, entre otras cuestiones.

El conocimiento de la morfología, anatomía y fisiología de esta especie, como así también la dinámica de la germinación y crecimiento de las plántulas proporcionaría las pautas necesarias para poder tomar las decisiones técnicas para un manejo adecuado de control.

CAPITULO 6

BIBLIOGRAFIA

- Acciaresi, H. y Chidichimo, H. 2005. Ecophysiological response of *Sorghum halepense* populations to reduced rates of nicosulfuron. *Pesq. Agrop. Bras.* Brasilia 40(6):451-457.
- Amrhein, N.; Deus, B.; Gehrke, P. y Steinrucken, H. 1980. The site of inhibition of the shikimate pathway by glyphosate. *Plant Physiology* 66:830-834.
- Ahmadi, M.; Haderlie, L. y Wicks, G. 1980. Effect of growth stage and water stress on barnyardgrass (*Echinochloa crus-galli*) control and on glyphosate absorption and translocation. *Weed Sci.* 28:277-282.
- Anton, L.; Ewers, F.; Hammerschmidt, R. y Klomparens, K. 1994. Mechanisms of deposition of epicuticular wax in leaves of broccoli, *Brassica oleracea* L. var. *capitata* L. *Nueva Phytol.* 126:505-510.
- Baerson, S.; Rodríguez, D.; Tran, M.; You, J.; Kreuger, R.; Dill, G.; Pratley, J. y Gruys, K. 2002. Investigating the mechanism of glyphosate resistance in rigid ryegrass (*Lolium rigidum*). *Weed Science* 50:721-730.
- Baker, H. 1974. The evolution of Weeds. *Annual Review of Ecology and Systematics* 5:1-24.
- Baker, E. 1982. Chemistry and morphology of plant epicuticular waxes. En: *The Plant Cuticle*, pp. 135-165, D.F. Cutler, K.L. Alvin y C.E. Price, eds. Academic Press, Londres.
- Beattie, G. y Marcell, L. 2002. Comparative dynamics of adherent and non adherent bacterial populations on maize leaves. *Phytopathology* 89:353-359.

- Benzing, D. and Renfrow, A. 1971. The significance of photosynthetic efficiency to habitat preference and phylogeny among tillandsioid bromeliads. *Botanical Gazette* 132: 19-30.
- Black, C.; Chen, T. y Brown, R. 1969. Biochemical basis for plant competition. *Weed Sci.* 17:338-343.
- Buchholz, A. y Schonherr, J. 2000. Thermodynamic analysis of diffusion of non-electrolytes across plant cuticles in the presence and absence of the plasticiser tributyl phosphate. *Planta* 212:103-111.
- Bukovac, M.J. 1976. Herbicide entry into plants. In: *Herbicides: Physiology, Biochemistry, Ecology*. Vol. I (ed. By Audus L.J.). Academic Press, New York, 335-364.
- Burkart, A. 1987. *Flora Ilustrada de Entre Ríos*. Tomo III, Argentina. Colección Científica de INTA, Buenos Aires.
- Campbell, W.; Evans, J. and Reed, S. 1976. Effects of glyphosate on chloroplast ultrastructure of quackgrass mesophyll cells. *Weed Science* 24:22-25.
- Carrasco-Ríos, L. 2009. Effect of ultraviolet-B radiation in plants. *IDESIA (Chile)* Vol. 27, N° 3, Pp 59-76.
- CASAFE. 2005. Estadísticas. Disponible en: <http://www.casafe.org/estadisticas/links.php>. Ultimo acceso: 5/07/2013.
- Catálogo de las Plantas Vasculares del Cono Sur (Argentina, Sur de Brasil, Chile, Paraguay y Uruguay).2008. 3486 pp. ISBN: 978-1-930723-70. Página web:<http://www.amjbot.org/content/95/12/local/advertising.pdf>.
- Cheavin, W. 1938. The crystals and cystoliths found in plant cells. Part I. Crystals. *The Microscope (Brit. Journal Microscope Photomicrogr.* 2:155-158.
- Cobb, A. y Reade, J. 2010. *Herbicides and plant physiology*. Oxford. Wiley-Blackwell. 286 pp.

- Cole, D. 1985. Mode of action of glyphosate a literature analysis. En: "The herbicide glyphosate". Grossbard, E.; Atkinson, D. (Eds.). Londres. Butterworth. 490 pp.
- Cortés, E. y Venier, F. 2012. Alternativas de control de *Gomphrena perennis* L. "siempre viva" en San Francisco, Córdoba (Argentina). INTA Unidad de extensión y experimentación San Francisco. Hoja de información técnica Nro 26. 5 pp. ISSN 2250-8546.
- Cranmer, J. y Linscott, D. 1990. Droplet makeup and the effect on phytotoxicity of glyphosate in velvetleaf (*Abutilon theophrasti*). Weed Sci. 38:406
- Cruz-Hipólito, H.; Osuna, M.; Domínguez-Valenzuela, J.; Gonzalez, F.; Medina-Pitalua, J. y De Prado, R. 2008. Resistencia de *Sinapis alba* a inhibidores de la ALS: Primer caso en el mundo. In: XXIX Congreso de la ASOMECEMA, Tapachula, Chiapas, México.
- Cruz-Hipólito, H.; Osuna, M.; Heredia, A.; Ruiz-Santaella, J.P. y De Prado, R. 2009. Nontarget Mechanisms involved in glyphosate tolerance found in *Canavalia ensiformis* plants. J. Agric. Food Chem. 57:4844-4848.
- Cruz-Hipólito, H.; Osuna, M.; Dominguez-Valenzuela, J.; Espinoza, N. y De Prado, R. 2011. Glyphosate tolerance by *Clitoria ternatea* and *Neonotonia wightii* plants involves differential absorption and translocation of the herbicide. Plant Soil 10.1104-1108.
- Culpepper, A. 2006. Glyphosate-induce weed shift. Weed Technol. 20:277-281.
- Dall'Armellina, A. and Zimdahl, R. 1989. Effect of watering frequency, drought, and glyphosate on growth of field bindweed (*Convolvulus arvensis* L.). Weed Sci. 36: 438-447.
- Dekker, J. y Duke, S. 1995. Herbicide resistance in field crops. Advances in Agronomy 54:69-116.
- De Prado, J.; Osuna, M.; Heredia, A. y De Prado, R. 2005. *Lolium rigidum*, a pool of resistance mechanisms to ACCase inhibitor herbicides. Journal of Agricultural and Food Chemistry 53: 2185-2191.

- Devine, M. y Hall, L. 1990. Implications of sucrose translocation mechanisms for the translocation of herbicides. *Weed Science* 38:299-304.
- Díaz Vivancos, P.; Driscoll, S.; Bulman, C.; Ying, L.; Emami, K.; Treumann, A.; Mauve, C.; Noctor, G. and Foyer, C. 2011. Perturbations of amino acid metabolism associated with glyphosate-dependent inhibition of shikimic acid metabolism affect cellular redox homeostasis and alter the abundance of proteins involved in photosynthesis and photorespiration. *Plant Physiology* 157:256-268.
- Dinelli, G.; Marotti, I.; Bonetti, A.; Minelli, M.; Catizone, P. y Barnes, J. 2006. Physiological and molecular insight on the mechanisms of resistance to glyphosate in *Conyza canadiensis* (L.) Cronq. biotypes. *Pesticide Biochemistry and Physiology* 86:30-41.
- Dinelli, G.; Marotti, I.; Bonetti, A.; Catizone, P.; Urbano, J. y Barnes, J. 2008. Physiological and molecular bases of glyphosate resistance in *Conyza bonariensis* biotypes from Spain. *Weed Research* 48:257-265.
- Dizeo de Strittmatter, C. 1986. Uso de técnicas de fluorescencia en materiales vegetales. *Parodiana* 4(2):213-220.
- Duke, S.; Baerson, S. and Rimando, A. 2003. Herbicides: glyphosate. En: "Encyclopedia of Agrochemicals". Plimmer, J.; Gammon, D.; Ragsdale, N. (Eds). New York. Wiley & Sons. 1638 pp. USA.
- Ehleringer, J. and Mooney, H. 1978. Leaf hairs: effects on physiological activity and adaptive value to a desert shrub. *Oecologia* 37:183-200.
- Ekboir, J. 2001. Sistemas de innovación y política tecnológica: siembra directa en el MERCOSUR (pp: 1-18). En: Díaz Rossello, R. (Ed.) Siembra directa en el cono sur. PROCISUR. Montevideo, Uruguay
- Espinoza, N.; Díaz, R.; y Zapata, M. 2005. Ballica (*Lolium multiflorum* Lam.) con resistencia a glifosato, glifosato-trimesium, iodosulfuron y flucarbazone sódico. In: Congreso de la Asociación Latinoamericana de malezas, 27 Congreso Iberoamericano de Ciencia de las Malezas. Varadero, Matanzas: p. 324.

- Essau, K. 1977. Anatomy of Seed Plants. 2da. Ed. Wiley, New York.
- Faccini, D. y Puricelli, E. 2007. Eficacia de herbicidas según las dosis y el estado de crecimiento de malezas presentes en un suelo en barbecho. *Agriscientia* 24:29-35.
- Fank-de-Carvalho, S.; Rodrigues de Aguiar Gomes, M.; Tanno Silva, P. y Bao, S. 2010. Leaf surfaces of *Gomphrena spp.* (Amaranthaceae) from Cerrado biome. *Biocell* 34(1):23-35.
- Feng, P.; Tran, M.; Chiu, T.; Sammons, R.; Heck, G. y Jacob, C. 2004. Investigations into glyphosate-resistant horseweed (*Conyza canadiensis*): retention, uptake, translocation, and metabolism. *Weed Science* 52:498-505.
- Franke, W. 1971. Über die Natur der Ektodesmen und einem vorschlag zur Terminologie. *Ber. Dtsch. Bot. Ges.* 84:533-537.
- Franz, J.; Mao, M. y Sikorski, J. 1997. Glyphosate: A unique and global herbicide. ACS Monograph No. 189. Washington. American Chemical Society. 653 pp.
- Fuchs, M.; Geiger, D.; Reynolds, T and Bourke, J. 2002. Mechanisms of glyphosate toxicity in velvetleaf (*Abutilon theophrasti* Medikus). *Pesticide Biochemistry and Physiology* 74:27-39.
- Gaines, T.; Zhang, W.; Wang, D.; Bukun, B.; Chisholm, S.; Shaner, D.; Nissen, S.; Patzoldt, W.; Tranel, P.; Culpepper, A.; Grey, T.; Webster, T.; Vencill, W.; Sammons, R.; Jiang, J.; Preston, C.; Leach, J. y Westra, P. 2010. Gene amplification confers glyphosate resistance in *Amaranthus palmeri*. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 107:1029-1034.
- García, M.; Jáuregui, D. y Medina, E. 2008. Adaptaciones anatómicas foliares en especies de angiospermas que crecen en la zona costera del Estado Falcón (Venezuela). *Acta Bot.Venez.* 31(1):291-306.
- Ge, X.; Davignon, D.; Ackerman, J. y Sammons, R. 2010. Rapid vacuolar sequestration: the horseweed glyphosate resistance mechanism. *Pest Management Science* 66:345-348.

- Geiger, D.; Kapitan, S. y Tucci, M. 1986. Glyphosate inhibits photosynthesis and allocation of carbon to starch in sugar beet leaves. *Plant Physiology* 82:468-472.
- Geiger, D. y Bestman, H. 1990. Self-limitation of herbicide mobility by phytotoxic action. *Weed Science* 38:324-329.
- Gressel, J. 2009. Evolving understanding of the evolution of herbicide resistance. *Pest Management Science* 65:1164-1173.
- Grime, J. 1979. Plant strategies and vegetation processes. *Journal of Ecology* 68(2):704-706.
- Gottrup, O.; O'Sullivan, P.; Schraa, R. y Vanden-Born, W. 1976. Uptake, translocation, metabolism and selectivity of glyphosate in Canadá thistle and leafyspurge. *Weed Res.* 16:197-201.
- Gougler, J. y Geiger, D. 1981. Uptake and distribution of N-phosphono-methylglycine in sugar beet plants. *Plant Physiology* 68:668-672.
- Gouret, E.; Rohr, R. y Chamel, A. 1993. Ultrastructure and chemical composition of some isolated plant cuticles in relation to their permeability to the herbicide diuron. *Nueva Phytology* 124:423-431.
- Hakansson, S. 2003. Weeds and weed management on arable land. An ecological approach. Cambridge. CABI Publishing. 274 pp.
- Hallam, N. 1982. Fine structure of the leaf cuticle and the origin of leaf waxes. En: *The Plant Cuticle*, pp. 197-214. Cutler, D.F.; Alvin, K.L. y Price, C.E., eds. Academic Press. Londres.
- Heap, I. 2011. The International Survey of Herbicide Resistant Weeds. Disponible en: <http://www.weedscience.org>. Último acceso: 11-12-13.
- Henry, W.; Shaner, D. y West, M. 2007. Shikimate accumulation in sunflower, wheat, and proso millet after glyphosate application. *Weed Science* 55:1-5.
- Herbicide Handbook Committee. 1994. Weed Science Society of America. 7th. ed. Champaign, USA.

- Herbicide Resistant Plants Committee. 1998. "HERBICIDE RESISTANCE" AND "HERBICIDE TOLERANCE" DEFINED. *Weed Technol.* 12: 789.
- Herrmann, N. 1995. *The creative brain*. 2da ed. Kingsport: Quebecor Printing Book Group.
- Hess, E. 1985. Herbicide absorption and translocation and their relationship to plant tolerances and susceptibility. In: *Weed Physiology*, Vol. II (Ed. By Duke S). CRC Press, Boca Raton, Fl. 191-214.
- Hull, H. 1970. Leaf structure as related to absorption of pesticides and other compounds. *Residue Reviews* 31:1-150.
- Hull, H.; Davis, D. and Stolzenberg, G. 1982. Actions of adjuvant on plant surface. In: *Adjuvants for Herbicides* (Ed. By Hodgson R). Weed Science Society of America, Lawrence, K.S. Pp. 26-67.
- Jeffree, C. 1996. Structure and ontogeny of plant cuticles. En: *Plant Cuticles: An Integrated Functional Approach*, pp. 33-82. G. Kerstients, ed. BIOS Scientific Publishers, Oxford.
- Jenks, M.; Rich, P. y Ashworth, E. 1994. Involvement of cork cells in the secretion of epicuticular wax filaments on *Sorghum bicolor* (L.) Moench. *International Journal Plant Science* 155:506-518.
- Johnson, H. 1974. Plant pubescence: an ecological perspective. *Botanical Rev.* 41:233-258.
- Jordan, T. 1977. Effects of temperature and relative humidity on the toxicity of glyphosate to bermudagrass (*Cynodon dactylon*). *Weed Science*, 25 (5): 448-451.
- Juniper, B. 1958. The surfaces of plants. *Endeavour* 18:20-25.
- Kirkwood, R. 1993. Use and mode of action of adjuvants to herbicides: a review of some current work. *Pesticide Science* 38:93-102.
- Koger, C. y Reddy, K. 2005. Role of absorption and translocation in the mechanism of glyphosate resistance in horseweed (*Conyza canadensis*). *Weed Science* 53, 84–9.

- Kunst, L. y Samuels, A. 2003. Biosynthesis and secretion of plant cuticular wax. *Prog. Lipid Research* 42:51-80.
- Labrada, R. y Parker, C. 1996. El control de malezas en el contexto del manejo integrado de plagas. En: "Manejo de malezas para países en desarrollo". Labrada, R.; Caseley, J. y Parker, C. Roma. FAO. 403 pp.
- Larcher, W. 2003. *Physiological plant ecology: ecophysiology and stress physiology of functional groups*. 4ta. ed. Springer, Alemania.
- Le Baron, H. and Gressel, J. 1982. *Herbicide resistance in plants*. Nueva York. Wiley & Sons. 441 pp.
- Leguizamón, E. 2008. *Historia de la agricultura y el control de malezas en la Argentina (material didáctico FCA-UNR)*.
- Lessire, R.; Abdul-Karim, T. y Cassagne, C. 1982. Origin of the wax very long chain fatty acids in leek, *Allium porrum* L. leaves: A plausible model. En: *The Plant Cuticles*, pp. 167-179. Cutler, D.F.; Alvin, K.L. y Price, C.E. eds. Academic Press. Londres.
- Levin, D. 1973. The role of trichomes in plant defense. *Q. Review Biology* 48:3-15.
- Lorraine-Colwill, D.; Powles, S.; Hawkes, T.; Hollinshead, P.; Warner, S. y Preston, C. 2003. Investigations into mechanism of glyphosate resistance in *Lolium rigidum*. *Pesticida Biochemistry and Physiology* 74:62-72.
- Luttge, U.; Klauke, B.; Griffiths, H.; Smith, J. and Stimmel, K. 1986. Comparative ecophysiology of CAM and C3 bromeliads. V. Gas exchange and leaf structure of the C3 bromeliad *Pitcairnia integrifolia*. *Plant, Cell and Environment* 9:411-419.
- Lyshede, O. 1982. Structure of the outer epidermal wall in xerophytes. En: *The plant cuticle*, pp.87-98. D.F. Cutler, K.L. Alvin y C.E. Price, eds. Academic Press, Londres.
- Madsen, K.; Heitholt, J.; Duke, S.; Smeda, R. y Streibig, J. 1995. Photosynthetic parameters in glyphosate-treated sugarbeet (*Beta vulgaris* L.). *Weed Research* 35:81-88.
- Marzocca, A.; Mársico, O. y Del Puerto, O. 1976. *Manual de malezas*. Editorial Hemisferio Sur. 564 pp.

- Mc Whorter, C. 1980. The physiological effects of adjuvants on plants. In: Weed Physiology: Herbicide Physiology. Vol. II (Ed. By Duke S). CRC Press, Boca Raton, FL, 141-158.
- Mc Whorter, C. y Azlin, W. 1978. Effects of environment on the toxicity of glyphosate to johnsongrass (*Sorghum halepense*) and soybeans (*Glycine max*). Weed Sci. 26:605-608.
- Margueritte Paz, C.; Diez de Ulzurum, T. and Leaden, M. 2009. Estudio de curvas de dosis–respuesta de poblaciones de *Lolium multiflorum* de baja sensibilidad al herbicida glifosato. XII Congreso SEM 2:489-492.
- Martin, R. y Edington, L. 1981. Comparative systemic translocation of several xenobiotics and sucrose. Pesticide Biochemistry and Physiology 16:87-96.
- Mengel, K. y Kirkby, E. 2001. Principles of plant nutrition. Dordrecht. Kluwer Academic Publishers. 849 pp.
- Metcalf, C. y Chalk, L. 1988. Anatomy of Dicotyledons. 2da. ed. Vol.2. Wood Structure and Conclusion of the general Introduction. Clarendon Press, Oxford.
- Michitte, P.; De Prado, R.; Espinoza, N.; Ruiz-Santaella, J. y Gauvrit, C. 2007. Mechanisms of resistance to glyphosate in a ryegrass (*Lolium multiflorum*) biotype from Chile. Weed Science 55:435-440.
- Millar, A.; Clemens, S.; Zachgo, S.; Giblin, E.; Taylor, D. y Kunst, L. 1999. CUTI, an Arabidopsis gene required for cuticular wax biosynthesis and pollen fertility, encodes a very-long-chain fatty acid condensing enzyme. Plant Cell II: 825-838.
- Miller, R. 1985. The prevalence of pores and canals in leaf cuticular membranes. Annals of Botany 55:459-471.
- Miller, R. 1986. The prevalence of pores and canals in leaf cuticular membranes. II. Annals of Botany 57:419-434.
- Molano-Flores, B. 2001. Herbivory and calcium concentrations affect calcium oxalate crystal formation in leaves of *Sida* (Malvaceae). Ann.Bot. 88:387-391.

- Monquero, P.; Christoffoleti, P.; Osuna, M. y De Prado, R. 2004. Absorción, translocación e metabolismo del glifosato por plantas tolerantes e susceptibles a este herbicida. *Planta Daninha*. 22:444-451.
- Nakata, P. 2003. Advances in our understanding of calcium oxalate crystal formation and function in plants. *Plant Science* 164:901-909.
- Nandula, V.; Reddy, K.; Poston, D.; Rimando, A. y Duke, S. 2008. Glyphosate tolerance mechanism in Italian ryegrass (*Lolium multiflorum*) from Mississippi. *Weed Science* 56:344-349.
- Neinhuis, C.; Koch, K. y Barthlott, W. 2001. Movement and regeneration of epicuticular waxes through plant cuticles. *Planta* 213:427-434.
- Nilsson, H. y Hallgren, E. 1989. Experiments with Roundup (glyphosate) for control of *Elymus repens* at different relative humidities and with dry and wetstands of *Elymus repens* application. An experiment in the greenhouse. Swedish Crop Protection Conference. 1989. Vol 2:251 -256. Listed in Weed Abstracts 1990. 039-02987
- Nisensohn, L. y Tuesca, D. 2001. Especies de malezas asociadas al nuevo modelo productivo de la región. Cátedra de Malezas, Facultad Ciencias Agrarias. UNR.
- Nisensohn, L.; Tuesca, D.; Angelotti, P. y Bonifazi, S. 2007a. *Portulaca gilliesii* Hook. y *Gomphrena perennis* L.: Especies con tolerancia al herbicida glifosato”. *Revista Agromensajes de la Facultad de Ciencias Agrarias, UNR*. ISSN:16698584. Disponible en: <http://www.fcagr.unr.edu.ar/Extension/Agromensajes/21/3AM21.htm>.
- Nisensohn, L.; Faccini, D.; Puricelli, E.; Tuesca, D.; Allieri, L. y Vecchi, S. 2007b. Malezas de reciente difusión en los agroecosistemas de la región sojera núcleo. Parte I. Rosario (AR): Universidad Nacional de Rosario. Facultad de Ciencias Agrarias. 104 p.
- Pengue, W. 2003. El Glifosato y la dominación del ambiente. *Rev. Biodiversidad, sustento y culturas*. Disponible en: <http://www.biodiversidadla.org/content/view/full/7636>. Último acceso: 27/11/2009.
- Perez Jones, A. y Kogan, M. 2003. Glyphosate-resistant *Lolium multiflorum* in Chilean orchards. *Weed Research* 43:12-19.

- Perez-Jones, A.; Park, K.; Colquhoun, J.; Mallory-Smith, C. y Shaner, D. 2005. Identification of glyphosate-resistant ryegrass (*Lolium multiflorum*) in Oregon. *Weed Science* 53:775-779.
- Perez-Jones, A.; Park, K.; Polge, N.; Colquhoun, J. y Mallory-Smith, C. 2007. Investigating the mechanisms of glyphosate-resistant in *Lolium multiflorum*. *Planta* 226:395-404.
- Piñeiro, D. 2003. Sustentabilidad y Democratización de las sociedades rurales de América Latina. En *Sociologías*, Porto Alegre. Año 5, n°10.
- Pline, W.; Wilcut, J.; Edmisten, K. y Wells, R. 2002a. Physiological and morphological response of glyphosate-resistant and non-glyphosate-resistant cotton seedlings to root-absorbed glyphosate. *Pesticide Biochemistry and Physiology* 73:48-58.
- Pline, W.; Wilcut, J.; Duke, S.; Edmisten, K. y Wells, R. 2002b. Tolerance and accumulation of shikimic acid in response to glyphosate applications in glyphosate-resistant and non-glyphosate-resistant cotton (*Gossypium hirsutum* L.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 50:506-512.
- Potter, J. y Jones, J. 1977. Leaf area partitioning as an important factor in growth. *Plant Physiol* 59 : 10-14.
- Powles, S. y Holtum, J. 1994. *Herbicide resistance in plants: biology and biochemistry*. Boca Raton. Lewis Publishers 353 pp.
- Powles, S. 2008. Evolved glyphosate-resistant weeds around the world: lessons to be learnt. *Pest Manag Sci* 64:360-365.
- Prychid, C. y Rudall, P. 1999. Calcium oxalate crystals in monocotyledons: a review of their structure and systematics. *Ann.Botany* 84:725-739.
- Puricelli; E. y Tuesca, D. 1997. Análisis de los cambios en las comunidades de malezas en sistemas de siembra directa y sus factores determinantes. *Revista Facultad de Agronomía*. La Plata. 102(1):97-118.

- Puricelli, E. and Tuesca, D. 2005. Efecto del sistema de labranza sobre la dinámica de la comunidad de malezas en trigo y en barbechos de secuencias de cultivos resistentes a glifosato. *Agriscientia* 22:69-78.
- Puricelli, E., Orioli, G. y Sabattini, M.R. 2005. Efecto de la temperatura sobre la germinación de *Anoda cristata*. *Revista de Investigaciones. Facultad de Ciencias Agrarias. UNR.* 5 (7):25-31.
- Puricelli, D. y Faccini, E. 2009. Efecto de la dosis de glifosato sobre la biomasa de malezas de barbecho al estado vegetativo y reproductivo. *Planta Daninha, Vicosa, M-G.* 27:303-307.
- Rainero, H. 2008. Problemática del manejo de malezas en sistemas productivos actuales. *Boletín de Divulgación Técnica Nro. 3. INTA-EEA Manfredi. Argentina.* 4pp.
- Reade, J.; Milner, L. y Cobb, A. 2004. A role for glutathione S-transferases in resistance to herbicides in grasses. *Weed Science* 52:468-474.
- Riederer, M. y Schreiber, L. 2001. Protecting against water loss: Analysis of the barrier properties of plant cuticles. *Journal Experimental Botany* 52:2023-2032.
- Ríos, A. 2005. Consideraciones sobre control de *Capin annoni*. En *Jornada de Divulgación sobre Reconocimiento y Control de Malezas (INIA La Estanzuela, UY).* Serie de Actividades de Difusión Nro 428 pp. 25.
- Rojano-Delgado, A.; Cruz-Hipolito, H.; De Prado, R.; Luque de Castro, M. y Franco, A. 2012. Limited uptake, translocation and enhanced metabolic degradation contribute to glyphosate tolerance in *Mucuna pruriens* var. *utilis* plants. *Phytochem* 73: 34–41.
- Román, E. 2004. Resistência de azevém (*Lolium multiflorum*) ao herbicida glyphosate. *Planta Daninha* 22(2):301-306.
- Roso, A. y Vidal, R. 2010. A modified phosphate-carrier protein theory is proposed as a non-target site mechanism for glyphosate resistance in weeds. *Planta Daninha* 28:1175-1185.

- Roth-Nebelsick, A.; Dieter, U.; Mosbrugger, V. y Kerp, H. 2001. Evolution and Function of Leaf Venation Architecture: A Review. *Annals of Botany* 87: 553-566.
- Santier, S. and Chamel, A. 1992. Penetration of glyphosate and diuron into and through isolated plant cuticles. *Weed Res.* 32:337-347.
- Santier, S. and Chamel, A. 1998. Reassessment of the role of cuticular waxes in the transfer of organic molecules cuticles. *Plant Physiology Biochemistry* 36:309-320.
- Satorre, E. 2005. Cambios tecnológicos en la agricultura argentina actual. *Ciencia Hoy* 15(87):24-31. <http://www.agrotecnicounne.com.ar/biblioteca/>
- Schonbrunn, E.; Eschenburg, S.; Shuttleworth, W.; Schloss, J.; Amrhein, N.; Evans, J. y Kabsch, W. 2002. Interaction of the herbicide glyphosate with its target enzyme 5-enolpyruvylshikimate 3-phosphate synthase in atomic detail. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 98:1376-1380.
- Schonherr, J. y Riederer, M. 1989. Foliar penetration and accumulation of organic chemicals in plant cuticles. *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology* 108:1-70.
- Schreiber, L.; Kirsch, T. y Riederer, M. 1996. Transport properties of cuticular waxes of *Fagus sylvatica* L. and *Picea abies* (L.) Karst: Estimation of size selectivity and tortuosity from diffusion coefficients of aliphatic molecules. *Planta* 198:104-109.
- Schreiber, L.; Skrabs, M.; Hartmann, K.; Diamantopoulos, P.; Simanova, E. y Santrucek, J. 2001. Effect of humidity on cuticular water permeability of isolated cuticular membranes and leaf disks. *Planta* 214:274-282.
- Shaner, D. 2000. The impact of glyphosate-tolerant crops on the use of other herbicides and on resistance management. *Pest Management Sci.* 54:263-273.
- Shaner, D.; Nadler-Hassar, T.; Henri, W. y Koger, C. 2005. A rapid in vivo shikimate assay with excised leaf disc. *Weed Science* 53:769-774.
- Shaner, D. 2009. The role of translocation as a mechanism of resistance to glyphosate. *Weed Science* 57:118-123.

- Singh and Shaner 1998. Rapid determination of glyphosate injury to plant and identification of glyphosate resistant plant. *Weed Technol.* 12:527-530.
- Skoss, J. 1955. Structure and composition of plant cuticle in relation to environmental factors and permeability. *Bot. Gaz.* 117 (1):55-72.
- Spencer, D.; Tau, W.; Liow, P.; Ksander, G.; Whitehand, L.; Weaver, S.; Olson, J. y Newhouser, M. 2008. Evaluation of glyphosate for managing giant reed (*Arundo donax*). *Invasive Plant Science and Management* 1(3):248-254.
- Sprankle, P.; Meggit, W. y Penner, D. 1975. Adsorption, action and translocation of glyphosate. *Weed Science* 23:235-240.
- Streibig, J. and Kudsk, P. 1993. Dose response curves and statistical models In: *Herbicide Bioassays*. CRC Press. Boca Ratón, FL. 270p. pp:30-55.
- Tuesca, D.; Nisensohn, I. y Papa, J.C. 2007. Para estar alerta: el sorgo de Alepo (*Sorghum halepense*) resistente a glifosato. *Soja. Para Mejorar la Producción* /36. EEA Oliveros INTA, Centro Regional Santa Fe. ISSN 1850-163X. pp.72-75.
- Valverde, B.; Riches, Ch. y Caseley, J.C. 2000. Prevención y manejo de malezas resistentes a herbicidas en arroz. *Experiencias en América Central con Echinochloa colona*. Costa Rica 135 pp.
- Valverde, B. y Gressel, J. 2006. El problema de la evolución y diseminación de la resistencia del *Sorghum halepense* a glifosato en Argentina. Informe de consultoría para SENASA. Disponible en: <http://www.sinavimo.gov.ar/files/informesensa.pdf>. Último acceso: 12/02/2010.
- Vila-Aiub, M.; Balbi, M.; Gundel, P.; Ghersa, C. and Powles, S. 2007. Evolution of Glyphosate-resistant Johnsongrass (*Sorghum halepense*) in Glyphosate-resistant Soybean. *Weed Sci.* 55: 566-571.
- Vila-Aiub, M.; Balbi, M.; Distéfano, A.; Fernández, L.; Hopp, E.; Yu, Q. y Powles, S. 2012. Glyphosate resistance in perennial *Sorghum halepense* (Johnsongrass) endowed by reduced glyphosate translocation and leaf uptake. *Pest Management Science* 68:430-436.

- Volk, G.; Lynch-Holm, V.; Kostman, T.; Goss, L. y Franceschi, V. 2002. The role of druse and raphide calcium oxalate crystals in tissue calcium regulation in *Pistia stratioides* leaves. *Plant Biology* 4:34-45.
- Wanamarta, G. and Penner, D. 1989. Foliar absorption of herbicides. *Weed Sci.* 4: 215-231.
- Wardlaw, I. 1990. The control of carbon partitioning in plants. *New Phytologist* 116:341-381.
- Weaver, I. y Hermann, K. 1997. Dynamics of the shikimate pathway in plants. *Trends in Plant Science* 2:346-351.
- Weed Science Society of America. 1998. Resistance and tolerance definitions. *Weed Technology* 12:789.
- Webster, T. and Sosnoskie, L. 2010. Loss of glyphosate efficacy: a changing weed spectrum in Georgia cotton. *Weed Science* 58:73-79.
- Westwood, J.; Yerkes, C.; De Gennaro, E. and Weller, S. 1997. Absorption and translocation of glyphosate in tolerant and susceptible biotypes of field bindweed (*Convolvulus arvensis* L.). *Weed Sci.* 45: 658-663.
- Wilkinson, H. 1979. The plant surface (mainly leaf). Part I: Stomata. En: *Anatomy of the Dicotyledons*, 2da. ed., vol. I, pp. 97-117. Metcalfe, C. and Chalk, L. Clarendon Press, Oxford.
- Wu, H.; Pratley, J.; Lemerle, D. and Haig, T. 2001. Allelopathy in wheat (*Triticum aestivum*). *Annals of Applied Biology* 139:1-9.
- Yannicari, M.; Istilart, C. y Gimenez, D. 2009 Evaluación de la resistencia a glifosato de una población de *Lolium perenne* L. del sur de la provincia de Buenos Aires. XII Congreso de la Sociedad Española de Malherbología. XIX Congreso de la Asociación Latinoamericana de Malezas. II Congreso Iberoamericano de Ciencias de las Malezas. Lisboa – Portugal.

- Yanniccari, M.; Istilart, C.; Gimenez, D y Castro, A.. 2012. Effects of glyphosate on the movement of assimilates of two *Lolium perenne* L. populations with differential herbicide sensitivity. *Environmental and Experimental Botany* (ISSN:0098-8472)82:14-19.
- Yanniccari, M. 2014. Estudio fisiológico y genético de biotipos de *Lolium perenne* L. resistentes a glifosato. Tesis doctoral Facultad de Ciencias Exactas, Departamento de Ciencias Biológicas, Universidad Nacional de La Plata.
- Yasour, H.; TenBrook, P.; Tjeerdema, R. and Fischer, A. 2008. Responses to clomazone and 5-ketoclomazone by *Echinochloa phyllopogon* resistant to multiple herbicides in Californian rice field. *Pest Management Science* 64:1031-1039.
- Yu, Q.; Cairns, A. y Powles, S. 2007. Glyphosate, paraquat and ACCase multiple herbicide resistance in a *Lolium rigidum* biotype. *Planta* 225:499-513.
- Yu, Q.; Abdallah, I.; Han, H.; Owen, M. y Powles, S. 2009. Distinct non-target site mechanisms endow resistance to glyphosate, ACCase and ALS-inhibiting herbicides in multiple herbicide-resistant *Lolium rigidum*. *Planta* 230:713-723.
- Zalenski, W. 1902. Über die Ausbildung der nervation ber verschiedenen Pflanzen. *Berichte der Deutschen Botanischen Gesellschaft*. Bd. 20:433-440.
- Zelaya, I.; Owen, M. y VanGessel, M. 2004. Inheritance of evolved glyphosate resistance in *Conyza canadiensis* (L.)Cronq. *Theoretical and Applied Genetics* 110:58-70.
- Zimdahl, R. 1993. *Fundamentals of Weeds Science*. Academic Press. San Diego, California. Pp. 15-39.
- Zobiole, L.; de Oliveira, R.; Kremer, R.; Constantin, J.; Bonato, C. and Muniz, M. 2010. Water use efficiency and photosynthesis of glyphosate-resistant soybean as affected by glyphosate. *Pesticide Biochemistry Physiology* 97: 182-193.

ANEXO I

Lámina 1. Estructura de la hoja de *G. perennis* en vista superficial.

Imagen A-B-E: Fotomicrografías con MO.

A: Material proveniente de Marcos Juárez (Córdoba) mostrando patrón de venación reticulado. Referencias: vm=vena media; vs= vena secundaria; a= areola.

B: Material proveniente de Marcos Juárez (Córdoba) mostrando detalle de areola con venilla incluida (flecha) y abundante cantidad de drusas (d).

Escalas: A-B-E= 100 micrones

Imagen C-D-F: Fotomicrografías con MEB.

C: Epidermis adaxial de hoja procedente de Marcos Juárez (Córdoba) con relativamente escasos tricomas.

D: Epidermis adaxial de hoja procedente de Banderas (Santiago del Estero) con relativamente abundantes tricomas.

Imágenes E y F: Detalle de tejido epidérmico y tricomas con caracteres comunes para ambos materiales analizados.

E: Detalle de las paredes de las células del tejido epidérmico onduladas. Las paredes de las células meristemoides de la base de los pelos rectas (flecha).

F: Detalle de tricoma simple, pluricelular, uniseriado con célula basal redondeada (flecha) y apical aguzada (punta de flecha).

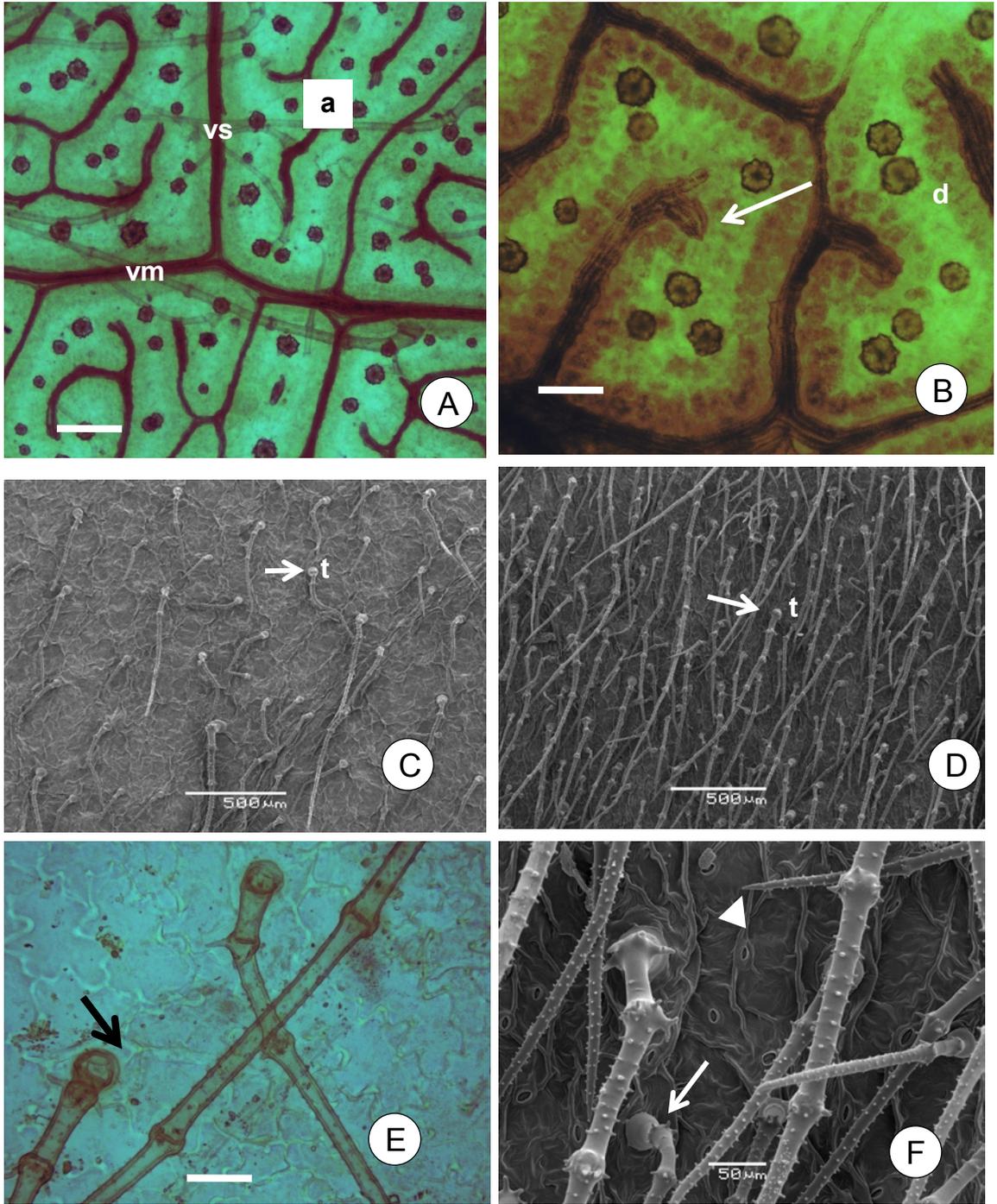


Lámina 1

Lámina 2. Detalle de los caracteres epidérmicos de la hoja de *G. perennis* posiblemente relacionados a la tolerancia al herbicida.

Imagen A-B-D-E-F: Fotomicrografías con MEB.

A: Material proveniente de Banderas (Santiago del Estero). Detalle de tricoma pluricelular con articulaciones nodosas (flecha).

B: Material proveniente de Banderas (Santiago del Estero). Detalle de los teicodes asociados a los tricomas (flechas).

Imagen C: Fotomicrografía con MO.

C: Material proveniente de Banderas (Santiago del Estero). Estoma anomocítico (ea señalado con flecha) y células epidérmicas comunes que rodean al estoma que no difieren del resto de las células.

D: Material proveniente de Banderas (Santiago del Estero). Estoma y depósito de ceras epicuticulares (c.epic.) en forma de escamas (flecha).

E: Material proveniente de Banderas (Santiago del Estero). Detalle de ceras epicuticulares en forma de escamas (flecha) en la superficie de hojas sin tratamiento de glifosato.

F: Material proveniente de Banderas (Santiago del Estero). Depósito de abundantes ceras epicuticulares (c.epic.) en forma de discos sobre la superficie foliar de hojas tratadas con la dosis recomendada de glifosato (flecha).

Escalas: C= 10 micrones

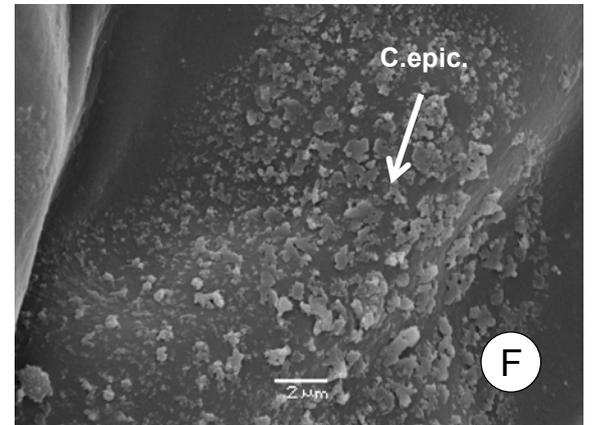
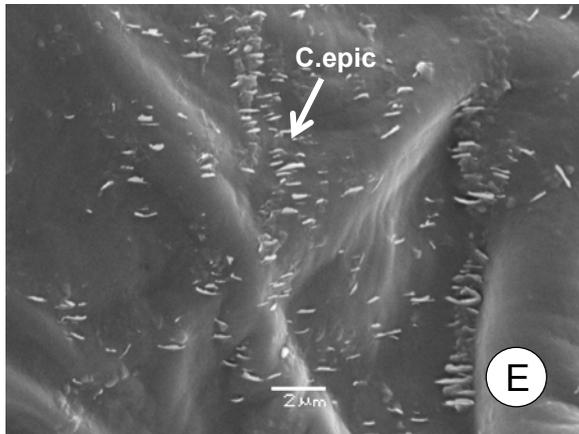
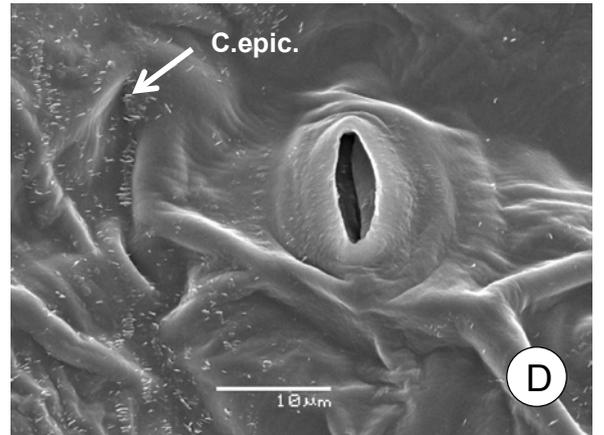
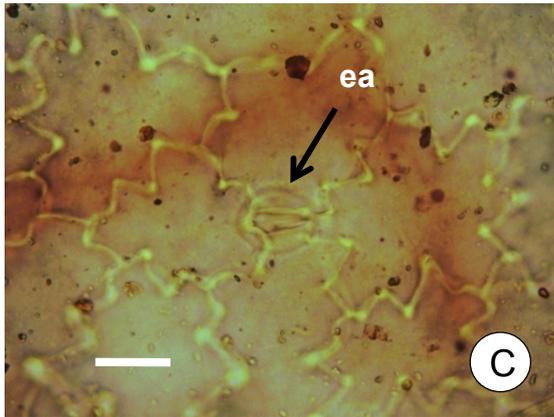
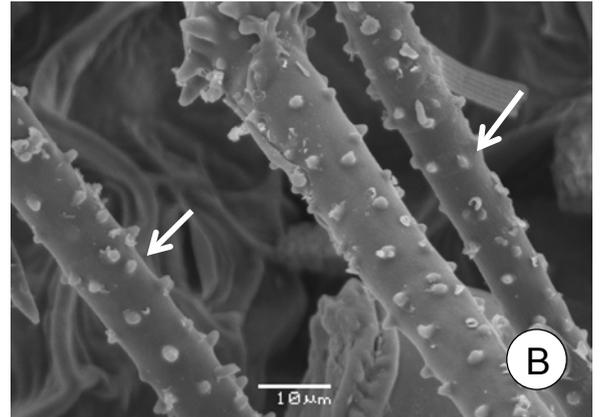
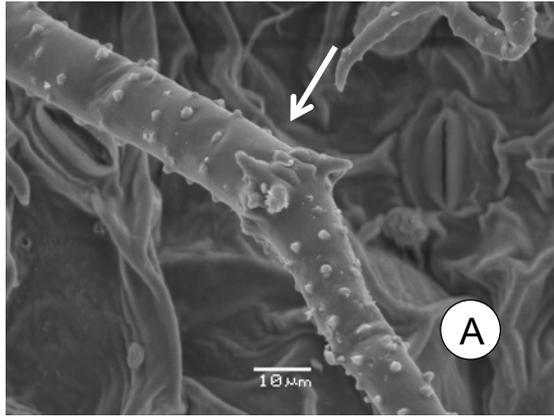


Lámina 2

Lámina 3. Estructura de la hoja de *G. perennis* en sección transversal.

Imagen A-B-C-D-E: Fotomicrografías con MO.

A-B. Material procedente de Marcos Juárez (Córdoba).

A: Corte transversal de la lámina señalando estoma (e) en la epidermis adaxial (flecha) y la estructura Kranz (flecha).

B: Corte transversal de la lámina mostrando estoma (e) en la epidermis abaxial (flecha).

C-D-E. Material procedente de Banderas (Santiago del Estero)

C: Corte transversal mostrando la estructura Kranz. Haz vascular rodeado por una vaina parenquimática (va: flecha) y mesófilo radiado (me: flecha). Presencia de tricomas (t) en la epidermis abaxial (flecha).

D: Detalle de la vena media rodeada por vaina parenquimática y mesófilo radiado. Presencia de abundante parénquima incoloro (mi: flecha) cercano a la epidermis abaxial (flecha).

E: Detalle de célula parenquimática conteniendo drusa (d: flecha).

Referencias: ead=epidermis adaxial; eab=epidermis abaxial; me=mesófilo clorofiliano radiado; va=vaina parenquimática que rodea al haz; mi= mesófilo incoloro; e=estoma; d=drusa; t=tricoma.

Escalas: A-B-C-D-E=100 micrones.

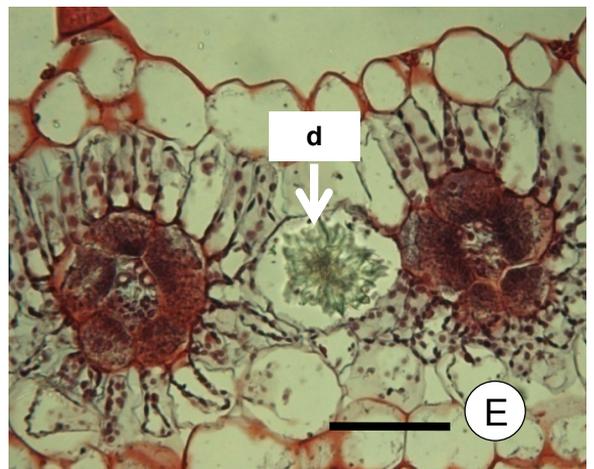
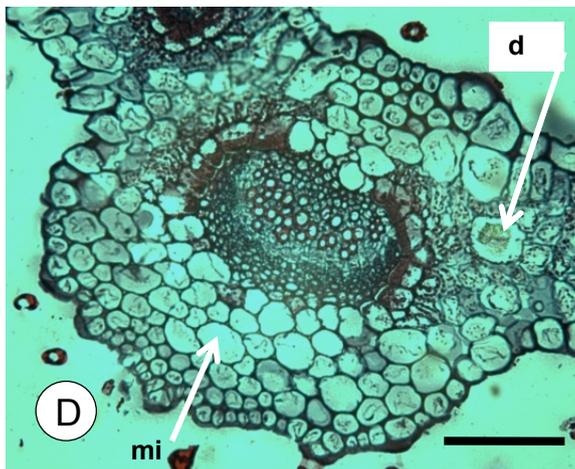
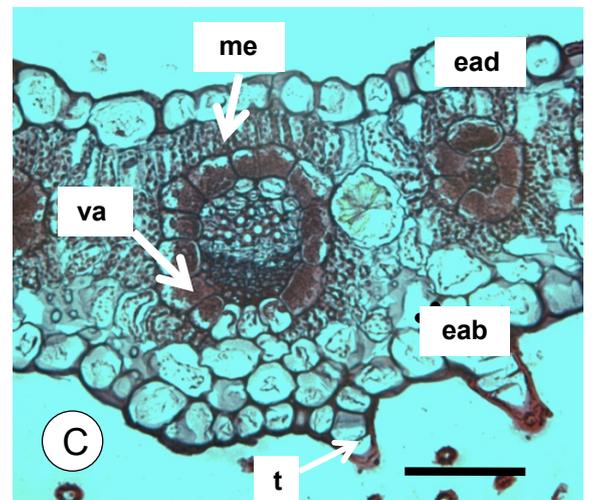
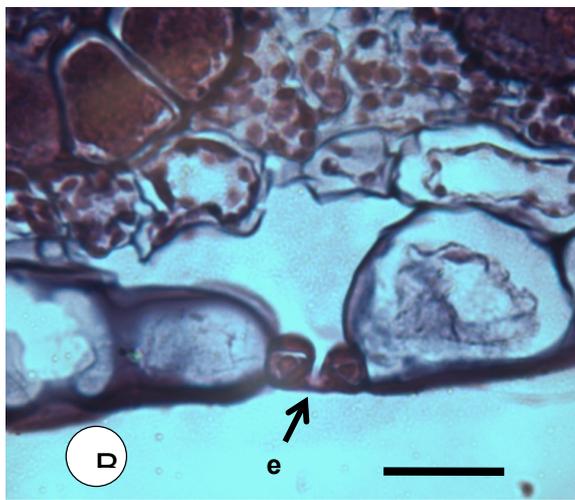


Lámina 3

Lámina 4. Material vegetal procedente de Marcos Juárez (Córdoba). Efectos de la aplicación del glifosato.

A: Vista general de las plántulas de *Gomphrena perennis* 3 días post-aplicación de las diferentes dosis del herbicida.

B: Plántula de *Gomphrena perennis* control (T0: derecha) y a la izquierda plántula a la que se aplicó la dosis recomendada de glifosato (T4: 1440 g.e.a) con síntomas de clorosis 7 días PA.

C. Vista general de las plántulas de *Gomphrena perennis* 10 días PA de las diferentes dosis del herbicida.

D. Detalle de los síntomas observados en las plántulas de *Gomphrena perennis* 10 días PA del glifosato. Izquierda: T4: dosis recomendada: 1440 g.e.a; centro: T5: doble de la dosis recomendada (2880 g.e.a) y a la derecha T6: 5760 g.e.a de glifosato.

Imagen E-F-G: Detalle de las plantas control, sin aplicación del herbicida a los 30 días de iniciado el ensayo.

Imagen H-I-J: Detalle de los síntomas observados en las plántulas que recibieron la dosis recomendada del herbicida (T4: 1440 g.e.a) a los 30 días de iniciado el ensayo.

H. Síntomas de clorosis en la zona apical (flecha).

I. Rebrote de yemas basales (flecha).

J. Separación y recuento de los brotes basales (flecha).

Imagen K-L: Síntomas observados en las plántulas que recibieron el doble de la dosis recomendada (T5: 2880 g.e.a) a los 30 días de iniciado el ensayo.

K. Síntomas de clorosis y necrosis en las hojas apicales (flecha).

L. Rebrote de yemas basales (flecha).

Imagen M-N: Síntomas observados en las plántulas que recibieron el cuádruple de la dosis recomendada (T6: 5760 g.e.a) a los 30 días de iniciado el ensayo.

M. Síntomas de clorosis y necrosis acentuada en las hojas apicales (flechas).

N. Rebrote de yemas basales en el cuello de la plántula (flecha).

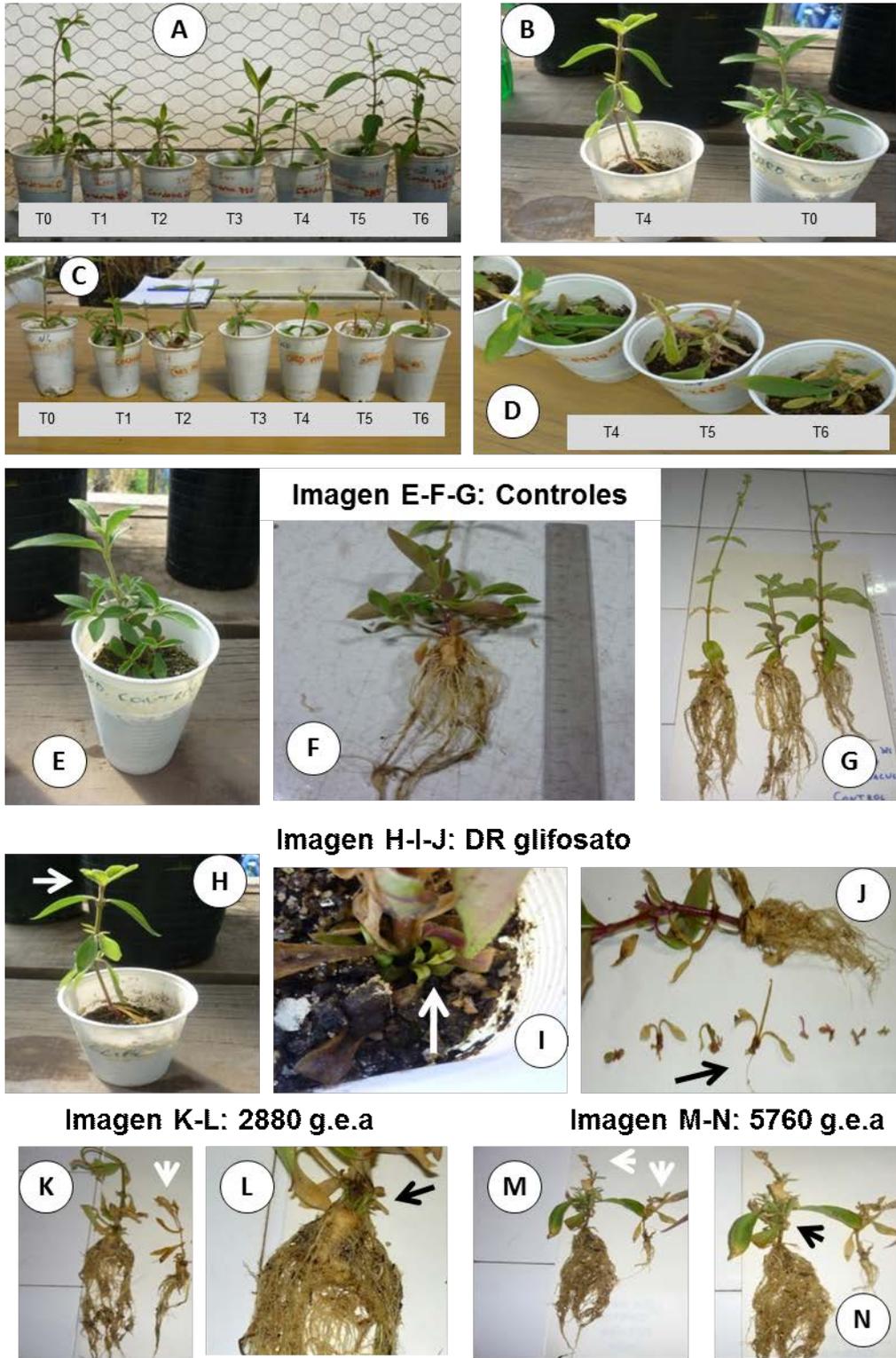


Lámina 4

Lámina 5. Material vegetal procedente de Banderas (Santiago del Estero). Efectos de la aplicación del glifosato.

A: Vista general de las plántulas de *Gomphrena perennis* 3 días post-aplicación (PA) de las diferentes dosis del herbicida.

B: Vista general de las plántulas de *Gomphrena perennis* 10 días PA de las diferentes dosis del herbicida. Las plántulas de los tratamientos T3-T4-T5 y T6 con severos daños de clorosis y necrosis en la parte aérea.

C. Plántula de *Gomphrena perennis* control a los 10 días de iniciado el ensayo.

D. Plántula de *Gomphrena perennis* control a los 30 días de iniciado el ensayo. Actividad de yemas axilares basales (flecha).

Imagen E-F. Detalle de los síntomas observados en las plántulas que recibieron la dosis recomendada del herbicida (T4: 1440 g.e.a) a los 30 días de iniciado el ensayo.

E. Síntomas de necrosis acentuados y generalizados en la parte aérea (flecha). En la plántula ubicada a la derecha se observa rebrote de yemas basales axilares (flecha).

F. Separación y recuento de los brotes basales (flecha).

Imagen G-H: Síntomas observados en plántulas que recibieron el doble de la dosis recomendada (T5: 2880 g.e.a) a los 30 días de iniciado el ensayo.

G. Síntomas de necrosis generalizada en la parte aérea (flecha).

H. Rebrote y separación de las yemas basales (flecha).

Imagen I-J: Síntomas observados en las plántulas que recibieron el cuádruple de la dosis recomendada (T6: 5760 g.e.a) a los 30 días de iniciado el ensayo.

I. Necrosis de la parte aérea y acentuada actividad de las yemas basales (flecha).

J. Rebrote y separación de las yemas basales (flecha).



Imagen E-F: DR glifosato



Imagen H-I: 2880 g.e.a

Imagen J-K: 5760 g.e.a



Lámina 5

ANEXO II.

Tabla 1.

Datos climáticos del año 2011 obtenidos en la Estación Experimental Julio Hirschon situada en los Hornos (partido de La Plata). Lat. 34 52 S Long. 58 W de G. SNM: 15 m.

	Temperatura del Aire C			Precipitación (mm)	HR %
	Media	Máxima	Mínima	Total mensual	Media mensual
Enero	23,5	29,5	18,1	136,4	68
Febrero	21,7	28,3	16,9	4,43	69
Marzo	20,1	26,5	14,0	35,2	67
Abril	16,8	22,9	11,3	71,8	71
Mayo	12,4	18,0	7,1	40,4	76
Junio	10,1	14,6	5,7	129,8	77
Julio	8,9	14,4	4,3	98,7	73
Agosto	9,7	14,1	4,6	56,0	76
Septiembre	13,7	20,0	5,3	21,4	64
Octubre	15,2	20,7	7,5	60,4	73
Noviembre	20,3	26,2	9,9	81,8	64
Diciembre	20,4	26,4	14,6	58,6	68

Tabla 2.

Datos climáticos del año 2011 obtenidos en el invernáculo del INFIVE-CONICET situada en la Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales, UNLP (partido de La Plata). Lat. 34 52 S Long. 58 W de G. SNM: 15 m.

	Temperatura del Aire C			Precipitación (mm)	HR %
	Media	Máxima	Mínima	Total mensual	Media mensual
Enero	27,2	33,5	21,0	--	70
Febrero	25,8	32,4	19,2	--	72
Marzo	23,5	30,1	17,0	--	68
Abril	20,0	25,8	14,3	--	70
Mayo	17,1	21,5	12,7	--	72
Junio	11,8	16,2	7,5	--	75
Julio	10,1	14,4	5,9	--	71
Agosto	11,8	16,8	6,8	--	75
Septiembre	16,0	23,0	9,0	--	66
Octubre	19,6	26,9	12,4	--	75
Noviembre	22,4	29,5	15,4	--	70
Diciembre	23,9	30,4	17,5	--	70

Tabla 3.

Datos climáticos del año 2011 obtenidos en la Estación Experimental Marcos Juárez (provincia de Córdoba). Lat. 32 41 00 S Long.62 09 00 W

	Temperatura del Aire C			Precipitación (mm)	HR %
	Media	Máxima	Mínima	Total mensual	Media mensual
Enero	24,6	31,8	17,4	111,5	65
Febrero	22,6	28,3	16,9	128,5	73
Marzo	21,5	28,7	14,3	67,5	65,9
Abril	18,2	25,1	11,3	76	64
Mayo	20,2	26,8	13,6	102,3	68
Junio	9,6	15,5	3,7	13,3	73
Julio	10,6	17,8	3,5	4,5	66
Agosto	12,2	19,6	4,9	1	61
Septiembre	17,1	24,9	9,4	111,5	52
Octubre	19,3	25,8	12,9	60,5	61
Noviembre	22,6	29,9	15,4	77,3	53
Diciembre	23,5	31,1	15,9	68	51

Tabla 4.

Datos climáticos del año 2011 obtenidos en la Estación Experimental Banderas (provincia de Santiago del Estero). Lat.28 28 00 S Long 62 06 00 W

	Temperatura del Aire C			Precipitación (mm)	HR %
	Media	Máxima	Mínima	Total mensual	Media mensual
Enero	25,5	34,1	16,9	140,8	66
Febrero	25,9	31,4	20,5	159,2	79
Marzo	22,8	29,3	16,4	79,3	77
Abril	21,5	27,3	15,7	0,3	75
Mayo	17,4	24,1	10,6	30,5	80
Junio	13,5	19,1	7,9	6,8	78
Julio	13,8	21,2	6,5	6,7	70
Agosto	14,5	22,8	6,19	0,0	63
Septiembre	20,2	29,2	11,3	33,5	48
Octubre	21,8	29,4	14,3	47,2	66
Noviembre	26,2	34,3	18,1	63,9	56
Diciembre	26,4	33,9	19,0	9,1	45