

UNIVERSIDAD NACIONAL DEL SUR

TESIS DE DOCTOR EN AGRONOMÍA

EFECTO MATERNO SOBRE CARACTERÍSTICAS MORFO-FISIOLÓGICAS DE SEMILLAS Y PLÁNTULAS DE Buglossoides arvensis L.

Ing. Agr. María de las Mercedes Longás

BAHÍA BLANCA

ARGENTINA

2018

PREFACIO

Esta Tesis se presenta como parte de los requisitos para optar al grado Académico de Doctor en Agronomía, de la Universidad Nacional del Sur y no ha sido presentada previamente para la obtención de otro título en esta Universidad u otra. La misma contiene los resultados obtenidos en investigaciones llevadas a cabo en el Departamento de Agronomía (UNS), y en el CERZOS (UNS-CONICET) Bahía Blanca, durante el período comprendido entre septiembre de 2010 y noviembre de 2017, bajo la dirección del Dr. Mario Ricardo Sabbatini y la codirección del Dr. Guillermo Rubén Chantre.

Ing. Agr. María de las Mercedes Longás

DNI: 31.994.373



UNIVERSIDAD NACIONAL DEL SUR Secretaría General de Posgrado y Educación Continua

La	presente	tesis	ha	sido	aprobada	el	/,	mereciendo	la
cali	ficación o	de		().		

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, quiero agradecerle a mi Dios por darme esta oportunidad y no abandonarme en lo duro que me resultó el camino. A mi familia que es mi sostén: mi hermana María Elizabeth Longás que desde el inicio hasta el último día estuvo presente para darme una mano, a mi papa, Jorge Eduardo Longás por cada consejo y a mi mamá, María Cristina Fahn por el aguante, especialmente en la última etapa de escritura.

Agradecerle a mi novio, Braian Robert, por cada abrazo y lograr que todo me resulte mas fácil en su compañía.

A todas mis amistades de la vida que sin entender me acompañaron en esto. Muy especialmente agradecer a mis dos amigas María Eugenia Tenina y la Dra. Vanesa Perillo por su apoyo constante.

A mi comunidad en la fe, con quienes me fortalezco.

A todas las personas del ámbito laboral que contribuyeron en este logro, especialmente a mis amigos y compañeros de trabajo los Ing Agr. Maria Laura Supiciche y Franco Molinari por sus buenas vibras y fomentar el trabajo conjunto. A mi director de tesis, Dr. Ricardo Sabbatini por cada palabra de aliento que me dio ánimos a seguir en este largo camino y a las Dras Lilan Descamps y Carolina Sanchez-Chopa y la Magister Silvia Freysinet que, con sus palabras y ejemplo de trabajo constante, metódico y en grupo fueron de vital ayuda en la realización y culminación de mi tesis.

Deseo hacer extensivo este agradecimiento al CONICET por otorgarme una beca interna doctoral en la temática de este trabajo de tesis, así como a la UNS, CONICET y a la Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica por financiar parcialmente las labores realizadas.

El Señor es mi pastor;
nada me falta.
En verdes praderas me hace descansar,
a las aguas tranquilas me conduce,
me da nuevas fuerzas
y me lleva por caminos rectos,
haciendo honor a su nombre.

Aunque pase por el más oscuro de los valles, no temeré peligro alguno porque Tú estás conmigo; tu vara y tu bastón me inspiran confianza.

Me has preparado un banquete ante los ojos de mis enemigos; has vertido perfume en mi cabeza y has llenado mi copa a rebosar. Tu bondad y Tu amor me acompañan a lo largo de mis días, y en tu casa, oh Señor, por siempre viviré.

Salmo 23 (22).

RESUMEN

En el sudoeste de la provincia de Buenos Aires, la diversificación en los sistemas productivos sumado a un ambiente impredecible, hacen que el escenario ambiental de producción agrícola-ganadera difiera año a año. El éxito de las malezas depende, en gran medida, de su adaptación a dichos cambios. Las mismas constan de diferentes estrategias, como ser el efecto materno: cambios fenotípicos transgeneracionales consecuentes de las condiciones ambientales imperantes durante el ciclo de vida de la planta madre, especialmente en el desarrollo seminal. Las variaciones morfo-fisiológicas que se generan en la descendencia, se expresan principalmente en los estadios iniciales contribuyendo al establecimiento de la plántula. Comprender los efectos ambientales sobre la ecología de las malezas es de gran utilidad para diseñar estrategias de manejo y control más efectivas. Buglossoides arvensis es una maleza anual facultativa de invierno de creciente expansión en el sudoeste de la provincia de Buenos Aires, Argentina. Los objetivos generales del presente trabajo de tesis consistieron en: i) comprender las diferencias en el nivel de dormición de semillas de B. arvense provenientes de madres con ambientes contrastantes y dilucidar el control hormonal y ii) determinar cambios en las características morfo fisiológicas de las semillas y plántulas vinculadas a diferentes ambientes, a los fines de comprender mejor la estrategia de adaptación al medio. Con la finalidad de cumplir con dichos objetivos se realizaron experimentos que contaron con una fase inicial de generación de las plantas madres bajo condiciones contrastantes de niveles nitrogenados y/o hídricos en el suelo y un gradiente de intensidad lumínica. Los ensayos de la descendencia incluyeron i) evaluaciones en plancha de gradiente térmico con el fin de modelar la dormición y poder predecir su dinámica en función del ambiente experimentado por la planta madre, ii) ensayos en laboratorio con hormonas y sus inhibidores para entender variaciones en la dormición a nivel fisiológico y iii) cuantificación de la emergencia en cámaras de crecimiento y medición de atributos morfológicos de las plántulas resultantes a fin de correlacionarlos con ventajas adaptativas en los primeros estadios de vida. Una mayor fertilización nitrogenada, una menor disponibilidad hídrica y una baja intensidad lumínica generaron una descendencia con mayores porcentajes de emergencia e hipocótilos más largos. El menor nivel de dormición de las semillas provenientes de madres fertilizadas y de las sometidas a estrés hídrico se explica por una mayor temperatura media máxima permisiva de germinación. Las semillas provenientes de plantas fertilizadas mostraron similar sensibilidad al ácido abscísico y giberélico, principales hormonas reguladoras de la dormición, y similar comportamiento ante el agregado de los inhibidores de síntesis hormonal. Los resultados manifiestan la importancia de los efectos maternos en la adaptación al ambiente de B. arvensis. Una germinación temprana da ventajas competitivas en la toma de recursos ante los competidores. El conocimiento de los cambios en el nivel innato de dormición y en la emergencia de la maleza proporciona indicios para la predicción de la emergencia en cohortes permitiendo optimizar el momento de control.

Palabras claves: *Lithospermum arvense* L., plasticidad adaptativa, plasticidad transgeneracional,

ABSTRACT

In the southwest zone of Buenos Aires' province, an unpredictable ambience plus the vast array of cultivation systems determines that the environmental situation for farming & livestock change year by year. The success of the weeds depends, to a great extent, on their adaptation to the mentioned changes. Weeds count with different strategies, such as the mother effect: transgenerational phenotypic changes consequent to the prevailing environmental conditions during the mother plant's life cycle, particularly in the seminal development. The morphophysiological variations generated in the offspring are expressed mainly in the initial stages contributing to the settlement of the seedling. Understanding the environmental effects on the ecology of the problematic weeds is of great help to design more effective management and control strategies. Buglossoides arvensis is an annual winter facultative weed species of growing expansion in the area of the study. The general objectives of this thesis consisted of: i) understanding of the differences in the dormancy level of B. arvensis due to the maternal environment and study of the hormonal control and ii) determination of the maternal influence on morpho-physiological characteristics of the offspring in seed and seedling state with the aim of better understanding the strategy of adaptation to the environment. In order to achieve such objectives experiments with an initial stage in which mother plants were obtained under contrasting conditions of nitrogen and water levels in the soil and with a light intensity gradient were performed. The offspring's test included i) evaluations on thermic plate to model dormancy and to predict its dynamic according to the environment experienced by the mother plant, ii) laboratory experiments with hormone imbibition and inhibitors to understand dormancy variations at a physiological level and iii) emergence quantification in a growing chamber and measurement of the morphologic traits of the seedlings. More nitrogen fertilization, less hydric availability and a low light intensity increases emergence percentages and produced longer hypocotyls. The lower dormancy level of the seeds originated from fertilized and water stressed parent plants is explained by higher maximum of medium germination-permissive temperature. Seeds originated in fertilized plants showed similar sensitiveness to abscisic and gibberellic acids, which are the main hormones in regulating dormancy and similar behavior after the addition of the hormonal synthesis inhibitors. This results show the importance of maternal effects on the environmental adaptation of B. arvensis. Early germination provides superior competitive advantage in resources capture. Knowledge of innate dormancy levels, and hence plant emergence, contributes to prediction of the emergence cohorts, optimizing the moment for the weed control.

Key words: *Lithospermum arvense* L., adaptive plasticity, transgenerational plasticity.

PUBLICACIONES DERIVADAS DE LA TESIS

LONGAS MM, CHANTRE GR & SABBATINI MR (2016) Soil nitrogen fertilization as a maternal effect on *Buglossoides arvensis* seed germinability. *Weed Research* **56** (6), 462-469.

ÍNDICE GENERAL

Contenido

Prefacio	II
Agradecimientos	V
Resumen	VI
Abstract	X
Publicaciones derivadas de la tesis	IX
Índice General	X
Índice de Figuras	XV
Índice de Tablas	XXII
Abreviaturas	XXV
Organización de la tesis	XXVI
CAPÍTULO I:	
Introducción General	1
1.1 Descripción de la especie <i>Buglossoides arvensis</i>	2
1.1.1 Descripción taxonómica	
1.1.2 Descripción morfológica y genética	2
1.1.3 Descripción fenológica	7
1.1.4 Hábitat	8
1.1.5 Origen y distribución	8
1.1.5.1 Distribución mundial	8
1.1.5.2 Distribución local	9
1.1.6 Buglossoides arvensis como maleza problemática	10
1.1.7 Manejo agronómico de la especie	10
1.1.7.1 Control químico	11
1.2 Bioecología del establecimiento de la especie	12
1.2.1 Dormición	12
1.2.1.1 Definición	12
1.2.1.2 Dormición fisiológica	13
1.2.1.3 Regulación hormonal	14
1.2.1.4 Modelización de la germinación	17
1.2.1.4.1 Modelos poblacionales basados en umbrales térmicos.	17
1.2.1.4.2 Curvas de dosis-respuesta	20
1.2.2 El proceso de germinación	21
1.2.3 Emergencia y estado de plántula	24

1.3 Efecto materno	. 27
1.3.1 Definiciones	. 27
1.3.2. Efecto materno: estrategia adaptativa	. 30
1.3.3 Agentes causales	. 30
1.3.3.1 Efecto de la planta madre	. 30
1.3.3.1 Efecto ambiental	. 31
1.3.4. Atributos de fuerte influencia materna y su importancia ecológica	. 32
1.4 Región semiárida del Sudoeste bonaerense	. 34
1.4.1 Partido de Bahía Blanca	. 35
1.4.2 Estación experimental del Conicet	. 36
1.5 Hipótesis y objetivos	. 37
CAPÍTULO II:	
Efecto trans-generacional de la fertilización nitrogenada y la disponibilidad hídrica en	n el
suelo sobre la germinabilidad de Buglossoides arvensis	. 39
2.1 Introducción	. 40
2.2 Materiales y métodos	
2.2.1 Material vegetal	
2.2.2 Generación de plantas madres	. 43
2.2.3 Test germinativos	. 46
2.2.4 Estimación de los parámetros térmicos poblacionales	. 47
2.2.5 Análisis estadísticos	. 47
2.3 Resultados	. 48
2.4 Discusión	. 54
CAPÍTULO III:	
Efecto del nivel nitrogenado materno sobre la respuesta hormonal y la germinabilidad	
Buglossoides arvensis	. 58
3.1 Introducción	. 59
3.2 Materiales y métodos	. 64
3.2.1. Material vegetal	. 64
3.2.2 Determinación del P ₁₀₀₀	. 65
3.2.3 Evaluación de la germinabilidad en respuesta a la aplicación exógena de hormonas	s 65
3.2.4 Análisis de datos	67
3.3 Resultados	. 68
3.3.1 Sensibilidad al GA ₃	. 68
3.3.2 Respuesta al paclobutrazol	. 68

3.3.3 Sensibilidad al ABA	69
3.3.4 Respuesta a la fluridona	69
3.3.5 Aplicaciones conjuntas	70
3.4 Discusión	73
CAPÍTULO IV:	
Efecto de la disponibilidad hídrica y nitrogenada de las plantas madre sob	re las
características morfo-fisiológicas de las semillas y plántulas de la progenie	78
4.1 Introducción	79
4.2 Materiales y métodos	82
4.2.1. Esquema sintético	82
4.2.2 Recolección del material original	83
4.2.3 Producción de las plantas madres	83
4.2.4 Tratamientos de efecto materno	83
4.2.5 Evaluación morfométrica de las plantas madres	84
4.2.6 Evaluación morfométrica seminal	85
4.2.7 Evaluación ecofisiológica de la descendencia	86
4.2.8 Evaluación morfométrica de las plántulas	86
4.2.9 Análisis estadísticos	87
4.3 Resultados	88
4.3.1 Evaluación morfométrica de las plantas madres	88
4.3.2 Evaluación morfométrica y ecofisiológica de las semillas (F ₁ y F ₂)	89
4.3.3 Atributos de la plántula	92
4.4 Discusión	94
4.4.1 Planta madre: plasticidad fenotípica	94
4.4.2 Atributos seminales	95
4.4.3 Emergencia	96
4.4.4 Atributos de la plántula	97
CAPÍTULO V:	
Efecto de la intensidad lumínica sobre las características morfo-fisiológicas	de la
descendencia en semilla y plántula	99
5.1 Introducción	100
5.2 Materiales y métodos	103
5.2.1. Origen del material	103
5.2.2 Producción de las plantas madres	104
5.2.3 Biomasa aérea de las plantas madres (solo 2014)	105
5 2 4 Características de las semillas	105

5.2.5 Características de las plántulas (solo para 2014)	105
5.2.6 Análisis estadísticos	106
5.3 Resultados	107
5.3.1 Atributos de las plantas madres	107
5.3.2 Características de las semillas	109
5.3.3 Patrones de Emergencia	110
5.3.4 Características de las plántulas	111
5.4 Discusión	112
CAPÍTULO VI:	
Discusión general	116
ANEXO I 1	141
ANEXO II 1	147
ANEXO III 1	175
ANEXO VI	178

ÍNDICE DE FIGURAS

CAPÍTULO I:

Figura 1.1 Diferentes arquitecturas de Buglossoides arvensis. a. Porte arbustivo ramificado
desde la base. b. Desarrollo de un único tallo con ramificación apical. c. Porte erecto con
ausencia de ramificaciones.
Figura 1.2 Estadios juveniles de <i>Buglossoides arvensis</i> . a. Estado de plántula. b. Cotiledones c. Estado de roseta. d. Planta joven, vista lateral (Adaptado de Zippel & Wilhalm, 2003. Página de internet: 1, 3).
Figura 1.3 <i>Buglossoides arvensis</i> L. a. Núculas. b. Plántula en estado de cotiledón. c. Plántula con primer par de hojas. d. Plántula en estado vegetativo ramificando desde los nudos. e Sección transversal de un tallo hueco. f. Raíz pivotante principal con raicillas laterales. g. Tallo floral ramificado de floración acrópeta. h. Pequeñas flores gamopétalas apicales. i. Núculas madurando provenientes del mismo ovario con el cáliz persistente. j. Plantas al momento de cosecha encontrándose la mayoría de las hojas secas y caídas.
Figura 1.4 Morfología de <i>Buglossoides arvensis</i> . a. Porte semiarbustivo, planta ramificada desde la base. b. Planta erecta de ramificación apical. c. Planta sin ramificaciones con floración basípeta. d. Cuello con hojas más antiguas en la parte apical y la raíz pivotante en la basal. el Hoja sésil entera, oblongo-lanceoladas a linear. f. Cáliz y corola. g. Corte longitudinal de la flor hermafrodita. h. Corola gamopétala sub-infundibuliforme. i. Ovario súpero tetralobulado j. Cara interna de la corola presentando las 5 líneas longitudinales de pelos. k. Pedúnculo inserción en el tallo sosteniendo las 4 núculas. l. Cáliz persistente. m. Núcula, corte latera exhibiendo el pericarpio, la testa y el embrión. n. Núcula, cara lateral. ñ. Núcula cara dorsal. o Núcula cara ventral con la unión carpelar visible. p. Núcula, corte transversal. q. Embrión con testa. r. Embrión. s. Detalle de la pubescencia foliar, base uniseriada. (Adaptado de Cecchi e al., 2014; Retief & Van Wyk, 2002; Zippel & Wilhalm, 2003. Páginas de internet: 8)
Figura 1.5 Países (★) donde se cita la presencia de <i>Buglossoides arvensis</i> (ANEXO I) 9 Figura 1.6 Distribución de <i>Buglossoides arvensis</i> (= <i>Lithospermum arvense</i>) en las distinta zonas agroecológicas del sudoeste de la provincia de Buenos Aires (Adaptado de Chantre 2010).
Figura 1.7 Estructura química de las fitohormonas: a. Ácido giberélico (GA ₃). b. Ácido abscísico (ABA).
Figura 1.8 Relación entre la tasa de germinación y la temperatura. A temperaturas sub-óptima la tasa de germinación ($r_{(g)} = 1/t_g$), para las diferentes fracciones (porcentajes) de semilla dentro de la población, aumenta linealmente con la temperatura partiendo de una temperatura

	base (T_b) común. Las pendientes de las lineas equivalen a la inversa del tiempo termal requerido
	para germinar (1/ $\theta_{T(g)}$), el cual varía entre semillas individuales sigiendo una distribución
	normal (gráfico anidado i.). La tasa máxima de germinación ocurre a la temperatura óptima
	(T_o) decreciendo linealmente por debajo de ella. La temperatura máxima de germinación $(T_{m(g)})$
	varía entre fracciones de semillas siguiendo una distribución normal (gráfico anidado ii.)
	(Adaptado de Bradford, 2002).
	Figura 1.9 Curva de dosis-respuesta log-logística correspondiente a la ecuacion 5. Los valores de los parámetros en este ejemplo son: D=100, C=4, I_{50} = 1 y b =2. El control corresponde a una dosis igual a cero (adaptado de Seefeld $et\ al.$, 1995).
	Figura 1.10 Gráfico generalizado mostrando los niveles relativos de agua (), peso seco y
	fresco (PS y PF) y hormonal en cada estado de desarrollo del embrión y de la plántula. Con
	Arresto del desarrollo se refiere al estado de quiescencia o dormición (Adaptado de Finkelstein, 2005).
	Figura 1.11 Diagrama de los efectos maternos y otras influencias sobre el fenotipo durante la
	generación de la progenie. Las flechas solidas representan los efectos maternos (Adaptado de
	Roach & Wulff, 1987)
	Figura 1.12 Representación generalizada del desarrollo del embrión en las angiospermas
	mostrando los tres estados principales de zigoto a plántula: embriogénesis, maduración y
	germinación. Momentos donde los efectos ambientales más influencias y más se manifiestan
	(Adaptado de Finkelstein, 2005).
	Figura 1.13 Distribución óptima de recursos maternos entre sus semillas en un ambiente
	determinado. (): Chances de una plántula de sobrevivir y establecerse en función de la masa seminal que le dio origen (——): perspectiva de sobrevivencia de todas las plántulas producidas
	en una camada de semillas. Desde el punto de vista genético, hay un punto de inflexión a partir
	del cual un mayor tamaño de semilla a expensas de un menor número de individuos, deja de
	ser conveniente. La mejor asignación de recursos a cada semilla es cuando se produce la mayor
	cantidad de semillas del tamaño menor que garantiza su supervivencia en la siguiente
	generación y por ende maximiza el <i>fitness</i> materno
	Figura 1.14 Sudoeste Bonaerense. a. Partidos. b. Isohietas. c. isotermas. (Adaptado de: Páginas
	de internet 5, 6, 7)
C	APÍTULO II:
	Figura 2.1 Diferencias en el crecimiento de <i>B. arvensis</i> debido a diferentes regímenes hídricos.
	a. síntomas de marchitez, especialmente en la parte apical. b. Plantas entrando en floración con
	baja disponibilidad hídrica. c. Plantas en floración con alta disponibilidad hídrica

Figura 2.2 Ensayo a campo de disponibilidad nitrogenada en las plantas madres de
Buglossoides arvensis. a. Preparación de las unidades experimentales, con aplicación del
rastrojo para evitar la pérdida de humedad por evaporación; b. Plantas en floración recibiendo
la segunda dosis de UREA granulada
Figura 2.3 Ensayos germinativos en la plancha de gradiente térmico de dos generaciones
sucesivas de Buglossoides arvensis. a. Ensayo realizado con las semillas cosechadas en enero
del 2012, siguiendo un diseño completamente aleatorizado. b. Detalle de los separadores de
acrílico que no permitía que se mezclen las repeticiones de 30 semillas. c. Ensayo realizado
con las semillas cosechadas en enero del 2013, siguiendo un diseño completamente
aleatorizado. d. Detalle de las divisiones utilizadas para separar los grupos de semillas 46
Figura 2.4 Valores de las estimaciones medias de la temperatura máxima de germinación $T_{m(50)}$
luego de 78, 136, 271 y 359 días de post-maduración para semillas de Buglossoides arvensis
cosechadas al momento de la dispersión natural de plantas madres sometidas a dos regímenes
hídricos contrastantes (Tabla 1). A. Valores medios en cada momento evaluado. B. Norma de
reacción de la temperatura media máxima. 48
Figura 2.5 Valores de las estimaciones medias del tiempo térmico sub-óptimo luego de 78, 136,
271 y 359 días de post-maduración para semillas de <i>Buglossoides arvensis</i> cosechadas al
momento de la dispersión natural de plantas madres sometidas a dos regímenes hídricos
contrastantes. Columnas con letras iguales no manifiestan diferencias estadísticas según el test
de Tukey (α =5%). Las letras mayúsculas indican diferencias entre los tratamientos
considerando todas las fechas y las minúsculas entre los regímenes hídricos en cada fecha. 50
Figura 2.6 Temperaturas diarias del aire máximas (), medias () y mínimas (· · ·) en el
campo durante la formación de la semilla (SF) (del 10 de noviembre al 25 de diciembre) y
durante el post-maduración sobre la planta madre (ARMP) (del 25 de diciembre hasta el 5 de
enero) para las temporadas (A) 2011-2012 y (B) 2012-2013
Figura 2.7 Temperatura media máxima de germinación $(T_{m(50)})$ medias de ambas generaciones
obtenidas para: (A) los diferentes niveles de fertilización nitrogenada maternales; y (B) ambos
períodos de almacenamiento en condiciones de laboratorio: PD, parcialmente dormidas (post-
maduración parcial) y ND, no dormidas (post-maduración completo). Barras con la misma letra
no son diferentes estadísticamente para un p =0,05 según el test de Tukey
Figura 2.8 Requerimientos de tiempo térmico sub-óptimo de germinación (θ_l) para la primera
y la segunda generación (F ₂): (A) en semillas parcialmente dormidas (PD) (90 días de post-
maduración) y no dormidas (ND) (380 días de post-maduración) y (B) para diferentes niveles
de fertilización nitrogenada maternales. Barras con la misma letra no son diferentes
estadísticamente para un $p=0.05$ según el test de Tukey. Las letras mayúsculas indican
j

diferencias entre progenies de semillas (B) y las minúsculas entre los tratamientos evaluados (A y B).
(A y B)
APÍTULO III:
Figura 3.1 Acciones del ácido giberélico (GA) y del ácido abscísico (ABA) en la germinación y su relación con la post-maduración. Adaptado de Debeaujon & Koornneef (2000) 63
Figura 3.2 Establecimiento del ensayo que generó las plantas madres del F ₂ a estudiar en el predio experimental del CERZOS (CONICET-UNS) a. Diseño completamente aleatorizado con tres réplicas.
Figura 3.3 Diseño del ensayo de germinación con dosis crecientes ABA, GA ₃ , paclobutrazol y fluridona. Detalle de la UE dividida por un separador de acrílico transparente
Figura 3.4 Curvas de dosis-respuesta para las accesiones provenientes de plantas sin fertilizar () y plantas fertilizadas () para las hormonas ácido giberélico (GA ₃) y ácido abscísico (ABA) y sus respectivos inhibidores, paclobutrazol y fluridona
Figura 3.5 Medias re-transformadas de arcoseno raíz de x (\pm ES) de la germinación máxima de la accesión fertilizada (cN) y sin la aplicación de nitrógeno (sN) bajo diferentes combinaciones hormonales y de sus inhibidores (100 μ M) a las temperaturas de 7, 15 y 20 °C. Diferentes letras minúsculas indican diferencias entre accesiones en cada situación testeada según el test de Tukey. Diferentes letras mayúsculas indican distinción entre los distintos tratamientos para los casos donde previamente no se evidenció interacción entre el TMA (Tratamiento materno-ambiental) y las drogas testeadas (p >0.05).
APÍTULO IV:
Figura 4.1 Influencias maternas sobre el fenotipo de la progenie. Las flechas negras señalan los efectos maternos mientras que las líneas punteadas la descendencia mendeliana. F representa al fenotipo, G menciona al genotipo y con la letra A se indica el ambiente. El subíndice m hace referencia a la planta madre y el d a la descendencia. A. Efecto del fenotipo materno: atributos de la descendencia responden directamente al fenotipo de la planta que les dió origen. B. Efecto del ambiente maternal: características maternas responden al ambiente circundante influyendo en su progenie. La descendencia puede ser afectada directamente por dichos factores ambientales. C. Efecto del ambiente de la progenie: el fenotipo de la descendencia se ve influenciado por su propio entorno afectando la manifestación del efecto materno. Adaptado de Donohue, (1999).
Figura 4.2 Esquema del trabajo realizado. TMA: Tratamiento Materno Ambiental, siendo H(0): baja y H(+): alta disponibilidad hídrica y N(0): 0, N(+): 75 y N(++): 150 kg N ha ⁻¹ . (i) Selección al azar de cuatro plantas madres por UE, cortadas al ras del suelo. De las mismas se extrajeron

se pusieron a emerger. Este procedimiento se siguió tanto para la F ₁ como para la F ₂ . (ii Cosecha del resto de las semillas producidas por UE, las que fueron re-sembradas para da origen a la siguiente generación (F ₂). N=24 (n=4).
Figura 4.3 Unidades experimentales donde se cultivaron las plantas madres siguiendo un DCA $(N=24,n=4)$.
Figura 4.4 Semilla de <i>Buglossoides arvensis</i> . a. Superficie rugosa exhibiendo la unión carpelar b. Perímetro seminal (triángulo isósceles dispuesto sobre un trapecio isósceles) y la relación ancho/largo.
Figura 4.5 Semilla germinada de <i>Buglossoides arvensis</i> . a. Embrión germinado con la radícula alargada. b. Pericarpio.
Figura 4.6 Ensayo de emergencia. a, b. Incubación en bandejas conteniendo sustrato a base de perlita. c. Rotulación individual para cada individuo.
Figura 4.7 Medias (\pm ES) re-transformadas del logaritmo del número de semillas por planta según el tratamiento materno ambiental de disponibilidad hídrica (H(0): baja, H(+): alta) para F_0 (2012) y F_1 (2013). Letras mayúsculas comparan resultados entre años y minúsculas entre tratamientos hídricos en cada año. Diferentes letras indican diferencias estadísticamente significativas según el test de Tukey (α =5%).
Figura 4.8 Peso medio (\pm ES) seminal de <i>Buglossoides arvensis</i> según los tratamientos materno ambientales de nivel hídrico (H(0): bajo y H(+): alto) y fertilización nitrogenada (N(0): 0, N(+) 75 y N(++): 150 kg N ha ⁻¹) para las semillas basales en los dos años de estudio. Letras iguales no manifiestan diferencias estadísticamente significativas según el test de Tukey (α =5%).
Figura 4.9 Relación lineal entre el peso de la semilla y el peso del embrión de <i>Buglossoide arvensis</i> para los diferentes tratamientos maternos ambientales (H(0): baja y H(+): alta disponibilidad hídrica y N(0): 0, N(+): 75 y N(++): 150 kg N ha ⁻¹).
Figura 4.10 Valores re transformados de arco-seno raíz para las medias (\pm ES) de ambos años de las proporciones de semillas no viables según los diferentes tratamientos evaluados: UPM ubicación en la planta madre (Ap: apical y Ba: basal) y TMA: tratamiento materno ambienta (H(0) y H(+): alta y baja disponibilidad hídrica; N(0), N(+) y N(++): 0, 75 y 150 kg N har respectivamente). Letras diferentes presentan diferencias estadísticas (α =5%) según el test de Tukey.
Figura 4.11 Valores medios (±ES) de atributos de <i>Buglossoides arvensis</i> según las diferente posiciones en la planta madre (UPM) (Ap. apicales, Ba. basales) para la F ₁ (2012) y la F

(2013). A. Porcentaje de emergencia B. Peso del pericarpio (mg). C. Perímetro cotiledonal (mm). Letras diferentes son estadísticamente diferentes según el test de Tukey (α=5%) 93
Figura 4.12 Medias (\pm ES) del largo del hipocótile de <i>Buglossoides arvensis</i> para los casos donde se encontró significancia estadística ($p>0,05$) debido a los tratamientos maternos ambientales: En el 2012 según la fertilización nitrogenada (N(0), N(+) y N(++): 0, 75 y 150 kg N ha ⁻¹ respectivamente) y en el 2013 según el régimen hídrico (H(0) y H(+): alta y baja disponibilidad hídrica). Letras diferentes son estadísticamente diferentes según el test de Tukey ($\alpha=5\%$).
CAPÍTULO V:
Figura 5.1 Generación a campo de las plantas madres con distitas condiciones de sombredo siguiendo un DCA.
Figura 5.2 Medias re-transformadas (\pm ES) de A. largo de tallo, B. peso seco aéreo y C. relación PS/L por planta para las tres intensidades lumínicas maternales (ILM) siendo AI: alta (PFD: 1068 µmol m ⁻² s ⁻¹), MI: media (PFD: 669 µmol m ⁻² s ⁻¹) y BI: baja intensidad (PDF: 255 µmol m ⁻² s ⁻¹) para la estación de crecimiento 2013-2014.
Figura 5.3 Medias re-transformadas de la producción seminal por planta para los tres ambientes lumínicos maternales (ILM): AI (alta intensidad), MI (media intensidad) y BI (baja intensidad) para las estaciones de crecimiento 2012/13 y 2013/14. Barras con la misma letra no son estadísticamente diferentes según el test de Tukey (α=5%). Las letras mayúsculas indican diferencias ente años mientras que las minúsculas entre ILM dentro de cada año
Figura 5.4 Peso medio (±ES) de mil semillas (P ₁₀₀₀) en gramos, para cada régimen de intensidad lumínica maternal (ILM): AI (alta intensidad), MI (media intensidad) y BI (baja intensidad) para las semillas de <i>Buglossoides arvensis</i> cosechadas en enero del 2013 y 2014. Barras con la misma letra no son estadísticamente diferentes según el test de Tukey (α=5%). Las letras mayúsculas indican diferencias ente años mientras que las minúsculas entre ILM dentro de cada año.
Figura 5.5 Porcentajes acumulados de emergencia de plántulas de <i>Buglossoides arvensis</i> durante un período de incubación de 30 días. Las semillas fueron obtenidas de plantas madres sujetas a diferentes intensidades lumínicas (ILM siendo AI: alta, MI: media y BI: baja intensidad).
Figura 5.6 Efectos del ambiente lumínico durante el desarrollo seminal sobre los porcentajes de viabilidad de las semillas (media \pm ES). Diferentes letras indican diferencias estadísticamente significativas según el test de Tukey (p <0,05)

	Figura 5.7 Datos re transformados de las medias (±ES) de las plántulas descendientes de
	semillas generadas bajo diferentes regímenes de intensidad lumínica (ILM siendo AI: alta, MI
	media y BI: baja intensidad) correspondientes a A. perímetro cotiledonal y B. largo de
	hipocótile por planta
A	NEXO II:
	Figura II.I Curvas promedio de germinación acumulada obtenidas experimentalmente () y
	simuladas (
	disponibilidad hídrica. Incubación por 21 días a 5, 8, 12, 16, 20 y 23 °C a 78 días de su cosecha
	Figura II.II Curvas promedio de germinación acumulada obtenidas experimentalmente () y
	simuladas (
	disponibilidad hídrica. Incubación por 21 días a 5, 8, 12, 16, 20 y 23 °C a 136 días de su cosecha.
	Figura II.III Curvas promedio de germinación acumulada obtenidas experimentalmente () y
	simuladas (——) provenientes de semillas cuyas madres fueron sometidas a baja o alta
	disponibilidad hídrica. Incubación por 21 días a 5, 8, 12, 16, 20 y 23 °C a 271 días de su
	cosecha
	Figura II.VI Curvas promedio de germinación acumulada obtenidas experimentalmente () y
	simuladas (
	disponibilidad hídrica. Incubación por 21 días a 5, 8, 12, 16, 20 y 23 °C a 359 días de su cosecha.
	Figura II.V Curvas de germinación acumulada, para el primer y segundo año experimental a
	los 90 y 380 días de post-germinación, obtenidas experimentalmente () y simuladas ()
	provenientes de semillas cuyas madres fueron sometidas a un gradiente de fertilización
	nitrogenada. Incubación por 21 días a 5, 8, 12, 16, 20 y 23 °C
A	NEXO III:
	Figura III.I Efectos del ABA, FLU, GA3 y PAC sobre la germinación de semillas dormidas
	derivadas de plantas sin fertilizar (barras blancas) y fertilizadas con urea granulada (barras
	negras) a 7, 15 y 20 °C. Los porcentajes de germinación fueron determinados luego de 32 días
	en función de las semillas viables. Se muestran los valores re-transformados de arc-coseno raíz
	las barras de error manifiestan el error estándar de la media de tres réplicas
	Figura III.II Curva de dosis-respuesta a dosis crecientes de ácido giberélico (GA ₃) de los valores
	promedios de las dos accesiones para las tres temperaturas evaluadas

ANEXO IV:

Figura IV.I Medias (±ES), por planta, re-transformadas del logaritmo de: A. Largo aéreo (tallos
y ramas) y B. Peso aéreo según el tratamiento materno ambiental de disponibilidad hídrica
(barras blancas: baja, barras negras: alta) para el 2012 (F ₀) y la siguiente generación en el 2013
(F1). Letras distintas indican diferencias estadísticamente significativas según el test de Tukey
(α=5%)
Figura IV.II Medias (±ES), por planta, re-transformadas del logaritmo del largo aéreo (tallos y
ramas) y del peso aéreo según el tratamiento materno ambiental de fertilización nitrogenada
$(N(0): 0, N(+): 75 \text{ y } N(++): 150 \text{ kg N ha}^{-1})$ para la F_1 (2013, plantas madres de la F_2). Letras
distintas indican diferencias estadísticamente significativas según el test de Tukey ($\alpha = 5\%$)
Figura IV.III Regresiones lineales de la producción seminal por planta en función de la biomasa
aérea. A. Cantidad de semillas producidas en función del largo total de tallos y ramas. B.
Cantidad de semillas producidas en función del peso de la biomasa aérea
Figura IV.IV Gráficos de cajas y brazos donde se expone toda la información del tamaño
seminal expresado como (A) perímetro y (B) área, de las semillas analizadas (n=1536) bajo las
diferentes ubicaciónes en la planta madre (apical y basal) y tratamientos maternos ambientales
(gradiente nitrogenado combinado con dos niveles hídricos) para los dos años de estudio. 182

ÍNDICE DE TABLAS

CAPÍTULO II:

	Tabla 2.1 Regresiones lineales entre los parámetros termales poblacionales: i) temperatura media máxima de germinación ($T_{m(50)}$), ii) tiempo térmico sub-óptimo (θ_I) y tiempo térmico de post-maduración (fase I: 2184 – 3808 °Cd; fase II: 3808 – 10052 °Cd) para semillas de B .
	arvensis recolectadas de plantas madres sujetas a dos regímenes hídricos contrastantes (H(0): baja irrigación, H(+): alta irrigación).
	Tabla 2.2 Parámetros termales estimados para dos generaciones sucesivas de semillas de <i>Buglossoides arvensis</i> (F_1 y F_2) provenientes de plantas madres sujetas a diferentes niveles crecientes de fertilización nitrogenada (Control, 75 kg N ha ⁻¹ : N(+) y 150 kg N ha ⁻¹ : N(++)). Las semillas correspondientes a la primera y a la segunda generación (F_1 y F_2) fueron cosechadas el 5 de enero del 2012 y 2013 respectivamente para luego ser incubadas a 5, 8, 12, 16, 20 y 23 °C luego de 90 y 380 días de almacenaje. Los parámetros fueron obtenidos según Chantre <i>et al.</i> (2009b) simulando las curvas de germinación en el tiempo y asumiendo una distribución normal tanto de T_b como de T_m en la población seminal
(CAPÍTULO III:
	Tabla 3.1 Drogas evaluadas, peso molecular (PM) y solvente utilizado en cada caso 65
	Tabla 3.2 Parámetros correspondientes a las curvas de dosis respuesta de la Figura 3.4. Cuando los valores poseen valores $p>0.05$ no hay diferencia entre las respuestas de las diferentes accesiones (sN: sin fertilizar y cN: con fertilizante) en cada situación
(CAPÍTULO IV:
	Tabla 4.1 Valores estadísticos (F) para los caracteres evaluados en las plantas madres según los tratamientos ambientales impuestos: N: fertilización nitrogenada y H ₂ O: disponibilidad hídrica.
	Tabla 4.2 Regresiones lineales de la producción de semillas de <i>Buglossoides arvensis</i> según el largo o el peso del tallo bajo los diferentes tratamientos maternos ambientales de disponibilidad hídrica (H(0): baja y H(+): alta) combinados con un gradiente de fertilización nitrogenada (N(0): 0, N(+): 75 y N(++): 150 kg N ha ⁻¹). Las regresiones fueron calculadas en promedio para los dos años.
	10S dos anos

	Tabla 4.3 Atributos morfológicos y fisiológicos promedios (±DS) de todas las semillas de
	Buglossoides arvensis evaluadas (n=1536), resultantes de dos generaciones sucesivas: 2012
	(F ₁) y 2013 (F ₂). Las mismas provienen de diferentes tratamientos maternos ambientales (TMA
	siendo H(0): baja y H(+): alta disponibilidad hídrica y N(0): 0, N(+): 75 y N(++): 150 kg N ha
	1) y de ubicación diferencial en la planta madre (UPM, correspondiendo Ap: apicales y Ba
	basales). Letras comparan el efecto de UPM dentro de cada TMA para las variables de
	perímetro, peso y emergencia según el test de Tukey
C	APÍTULO II:
	Tabla 2.1 Regresiones lineales entre los parámetros termales poblacionales: i) temperatura
	media máxima de germinación ($T_{c(50)}$), ii) tiempo térmico sub-óptimo (θ_I) y tiempo térmico de
	post-maduración (fase I: 2184 – 3808 °C.d; fase II: 3808 – 10052 °C.d) para semillas de B
	arvensis recolectadas de plantas madres sujetas a dos regímenes hídricos contrastantes (H(0)
	baja irrigación H(+): alta irrigación)
A	NEXO III:
	Tabla III.I Efectos de las dosis de las hormonas testeadas (GA ₃ : ácido giberélico; PAC
	paclobutrazol; ABA: ácido abscísico y FLU: fluridona) en semillas de madres sN (madres sir
	fertilizar) y cN (madres fertilizadas) en condiciones de temperatura sub-óptima (7 °C), óptima
	(15 °C) y supra-óptima (20 °C)
A	NEXO IV:
	Tabla IV.I Pantas logradas en cada UE en cada año. Los diferentes tratamientos a los que fueror
	sometidos las plantas no ejercieron influencia en el número total de plantas logradas (p>0,05)

ABREVIATURAS

Significado **Abreviatura** Ácido Abscísico **ABA** Alta Intensidad Lumínica (luz solar directa) ΑI Semillas apicales (seleccionadas) Ap Año de Producción AP Ba Semillas basales (seleccionadas) ΒI Baja Intensidad Lumínica (76% sombreado neutral) cNTratamiento nitrogenado DA Densidad Aérea DCA Diseño Completamente Aleatorizado DPS Días Post Siembra **FLU** Fluridona (1-methyl-3-phenyl-5-[3-trifluoromethyl(phenyl)]-4-(1//)-pyridinone) G Generación Cierta fracción de la población g GA_3 Ácido Giberélico GAs Giberelinas Agua, tratamiento maternal de disponibilidad hídrica en el suelo H_2O H(0)Tratamiento maternal de baja disponibilidad hídrica en el suelo Tratamiento maternal de alta disponibilidad hídrica en el suelo H(+)Dosis efectiva de 50% de respuesta I_{50} IF Índice de Forma **ILM** Intensidades Lumínicas Maternales L Largo de Tallos Media Intensidad Lumínica (37% sombreado neutral) MI Tratamiento maternal referente al nivel de nitrógeno aplicado al suelo N ND Semillas No Dormidas N(0)Tratamiento maternal sin fertilización nitrogenada Tratamiento maternal de adición de 75 kg N ha⁻¹ N(+)Tratamiento maternal de adición de 150 kg N ha⁻¹ N(++)Peso de Mil Semillas P_{1000} PD Parcialmente Dormidas PF Peso Fresco PM Peso Molecular **PMS** Planta Madre Seleccionada PS Peso Seco Tasa de germinación Tratamiento sin nitrógeno sNSO Sudoeste SS Semilla Seleccionada al Azar TA Tiempo de post-maduración TTemperatura ambiental T_h Temperatura base de germinación T_m Temperatura máxima de germinación

Temperatura óptima de germinación

 T_o

XXVI

TMA Tratamiento Materno Ambiental

UE Unidad Experimental

UPLUbicación en la Planta Madre θ Tiempo térmico o constante termal

 θ_1 Tiempo térmico sub-óptimo θ_2 Tiempo térmico supra-óptimo

 σT_b Desvío estándar de la distribución normal de la germinación en T_b σT_m Desvío estándar de la distribución normal de la germinación en T_m

 Φ Integral de la probabilidad normal

 $\begin{array}{ll} \psi & & Potencial \ agua \\ \mu M & & Micromolar \\ ^{\circ}Cd & Grados \ día \end{array}$

ORGANIZACIÓN DE LA TESIS

La presente tesis se ocupa de estudiar la influencia del efecto materno en características tempranas de la progenie en Buglossoides arvensis para entender su comportamiento bajo diferentes escenarios ambientales, y de esta manera poder predecir su ocurrencia optimizando su control. La tesis se estructura en seis capítulos: en el primero se desarrolla una introducción general de la temática abordada, la cual finaliza con el enunciado de las hipótesis y objetivos. Los resultados obtenidos se presentan en los capítulos 2, 3, 4 y 5, habiéndose redactado una introducción al tema, los materiales y métodos correspondientes y discutido los resultados. En el Capítulo 1 se modela y analiza la dormición de semillas provenientes de ambientes con fertilización nitrogenada e, independientemente, disponibilidad hídrica diferencial. En el Capítulo 2 se evalúa la relación hormonal con niveles diferenciales de dormición innata en progenies cuyas madres fueron fertilizadas de manera contrastante. En los Capítulos 3 y 4 se analizan caracteres morfológicos seminales y de las plántulas resultantes, así como la emergencia de progenies cuyas madres fueron sometidas a un gradiente de factores ambientales. En el Capítulo 3 se desarrolló un gradiente nitrogenado en interacción con dos condiciones hídricas contrastantes mientras que en el Capítulo 4 se generaron tres niveles de intensidad lumínica. Finalmente, la discusión general toma lugar en el Capítulo 6.

CAPÍTULO I

Introducción General

En la primera parte del presente capítulo se describe la especie, su hábitat, distribución, así como distintos aspectos de su manejo agropecuario. A continuación, se detallan aspectos generales y específicos de la especie en las temáticas de la dormición, germinación, emergencia y efecto materno. Luego se describen las características de la región semiárida en la que se efectúa el estudio, para finalmente enunciar las hipótesis y objetivos del trabajo.

1.1 Descripción de la especie Buglossoides arvensis

1.1.1 Descripción taxonómica

Buglossoides arvensis (L.) I.M. Johnston (= Lithospermum arvense L., Lithospermum officinale Molfino, hom. illeg., Aegonychon arvense Gray, Margarospermum arvense (L.) Decne. y Rhytispermum arvense L. Link.) (Weigend & Álvarez, 2014), vulgarmente conocida como "Yuyo moro" o "Mijo de sol" (Marzocca et al., 1993; Lamberto et al., 1997) pertenece a la tribu Lithospermeae, familia Boraginaceae y subfamilia Boraginoideae.

La historia taxonómica de los géneros *Buglossoides-Lithospermum* es compleja encontrándose aún en continuo cambio (Cohen & Davis, 2009; Cecchi *et al.*, 2014). En el pasado, *Lithospermum arvense* y *Buglossoides arvensis* eran clasificadas en tribus diferentes. Actualmente ambos nombres se aplican a la misma planta (Tocher *et al.*, 2010). En 1954, Johnston distinguió dichos géneros entre sí por las cinco líneas verticales de pelos presentes dentro de la corola de *Buglossoides* y no de *Lithospermum*. Esta distinción fue ampliamente aceptada. Otras diferencias se encuentran en las anteras, cortas y apiculadas, y las núculas, rugosas y tuberculadas en *Buglossoides* (Cecchi *et al.*, 2014; Retief & Van Wyk, 2002). Cohen & Davis (2009) también los distinguen por el color de las corolas: *Lithospermum* presenta flores únicamente blancas y *Buglossoides* blancas, pero también de tonalidades azuladas.

1.1.2 Descripción morfológica y genética

Buglossoides arvensis es una especie herbácea de hábito de crecimiento indeterminado. Generalmente presenta tallos erguidos (15-50 cm de altura) de sección circular, delgados, huecos y cubiertos de tricomas blancos (0,3-0,8 mm). Dada su gran plasticidad fenotípica, en ausencia de competencia intra e inter-específica, alcanza un porte semi-arbustivo muy ramificado desde la base. Pero en altas densidades desarrolla un único tallo con una menor ramificación y solo en la porción apical (Peters & Gerowitt, 2014) (Figura 1.1a-c).



Figura 1.1 Diferentes arquitecturas de *Buglossoides arvensis*. **a**. Porte arbustivo ramificado desde la base. **b**. Desarrollo de un único tallo con ramificación apical. **c**. Porte erecto con ausencia de ramificaciones.

Presenta raíz pivotante, superficial (≈ 15 cm) y rojiza (Figura 1.3f, 1.4d). Posee hojas alternas, simples, enteras, oblongo-lanceoladas a lineares de 1,2-5 cm * 3-12 cm, ápice agudo-acuminado y base semi-amplexicaule. Son sésiles o subsésiles (Figura 1.3d, 1.4e). Disminuyen su tamaño hacia el ápice. En cada hoja, solo su nervio central es visible. Los márgenes son lisos y ciliados. Enseñan pilosidad en ambas caras: muy densa en la adaxial (Figura 1.4s) pero de distribución diferencial en la abaxial: numerosos en la vena central y esparcidos en la lámina.

La inflorescencia es una cima escorpioide, pero como se puede apreciar en la Figura 1.2g los límites de la misma son difusos. La inflorescencia puede interrumpirse en nuevas ramificaciones laterales, las que también florecerán. Podría llegar a considerarse que estas ramificaciones dan lugar a inflorescencias secundarias y a su vez, si estas también ramifican, a inflorescencias terciarias. Las flores, actinomorfas y hermafroditas, son compactas y escasas (Figura 1.3f-j). Están sostenidas por un pedicelo corto y fino (Figura 1.4k-l). El cáliz persistente es constituido por cinco sépalos unidos en la base. La corola gamopétala sub-infundibuliforme es blanquecina, de 5-7 cm de longitud. Los cinco estambres cortos se encuentran unidos debajo de la mitad del tubo y exhiben anteras oblongas de dehiscencia longitudinal. El ovario súpero, ginobásico (el estilo se prolonga por el interior del ovario hasta alcanzar su base), bicarpelar y

tetralobulado dará lugar a cuatro clusas o núculas (Figura 1.3i, 1.4l). Las núculas son erguidas, cónicas-ovoides, 2-3 mm * 1,4-2 mm, de base plana u obtusa, aquilladas y rugoso-tuberculadas (Figura 1.3a,1.4m-p) (Retief & Van Wyk, 2002; Lamberto *et al.*, 1997).

Bischoff (2005) contabilizó en promedio entre 20 y 25 frutos por planta. Peters *et al.* (2015) obtuvieron entre 120 y 170 semillas por planta, correspondiendo los menores valores a ambientes más cálidos o en presencia de alta densidad de trigo. En tanto que Lang *et al.* (2016) computó de 36 a 396 núculas por individuo, decreciendo su producción al incrementarse el número de plantas por unidad de superficie.

Las núculas, frutos uniseminados, no poseen estructuras morfológicas adaptadas para la dispersión. Si a ello se le suma que a la madurez tienden a permanecer adheridas a la planta madre, al diseminarse no superan los 2 m de distancia (Bischoff, 2005; Bonn, 2005).

En estado de plántula, presenta un hipocótile de alrededor de un centímetro de tintes rojizos-amarronados (Figura 1.2d-1.3b). Los cotiledones son oblongos con una tenue pilosidad que cubre ambas caras (Figura 1.2a-c, 1.3c). Algunos autores (Cecchi *et al.*, 2014; Zippel & Wilhalm, 2003) los describen con venas secundarias notorias.

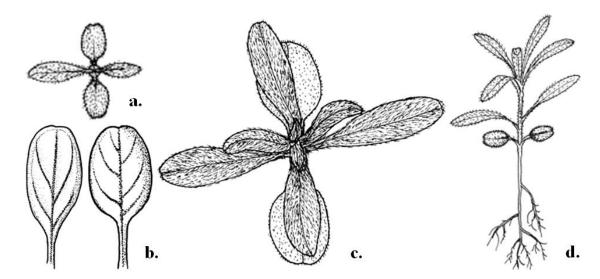


Figura 1.2 Estadios juveniles de *Buglossoides arvensis*. **a.** Estado de plántula. **b.** Cotiledones. **c.** Estado de roseta. **d.** Planta joven, vista lateral (Adaptado de Zippel & Wilhalm, 2003. Páginas de internet: 1, 3).

Genéticamente se trata de una especie que muestra una gran variación en su número base como en el nivel de ploidía lo que puede estar relacionado con su amplio polimorfismo morfológico. Se registran poblaciones con un número base x = 9 (2n = 4x = 36) y también x = 7 (2n = 14, 28 y 42) (Coppi *et al.*, 2006; Luque & Diaz Lifante, 1991).

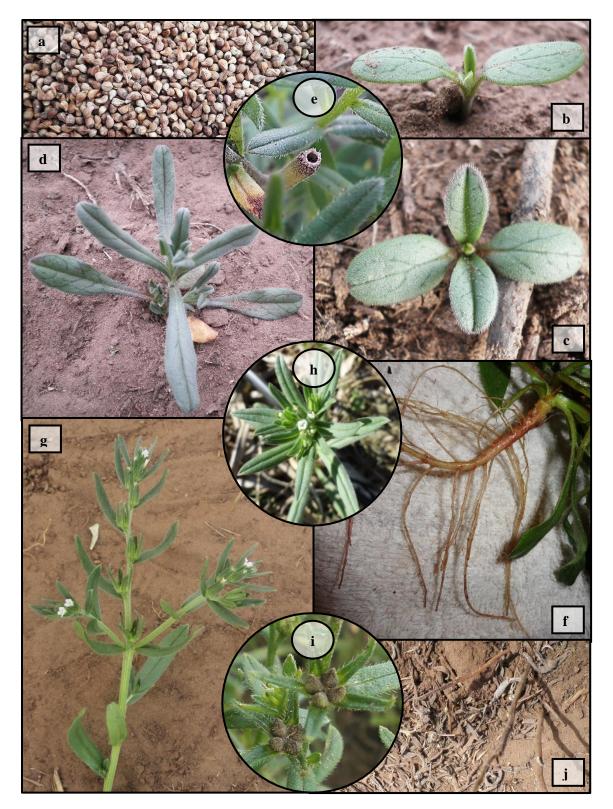
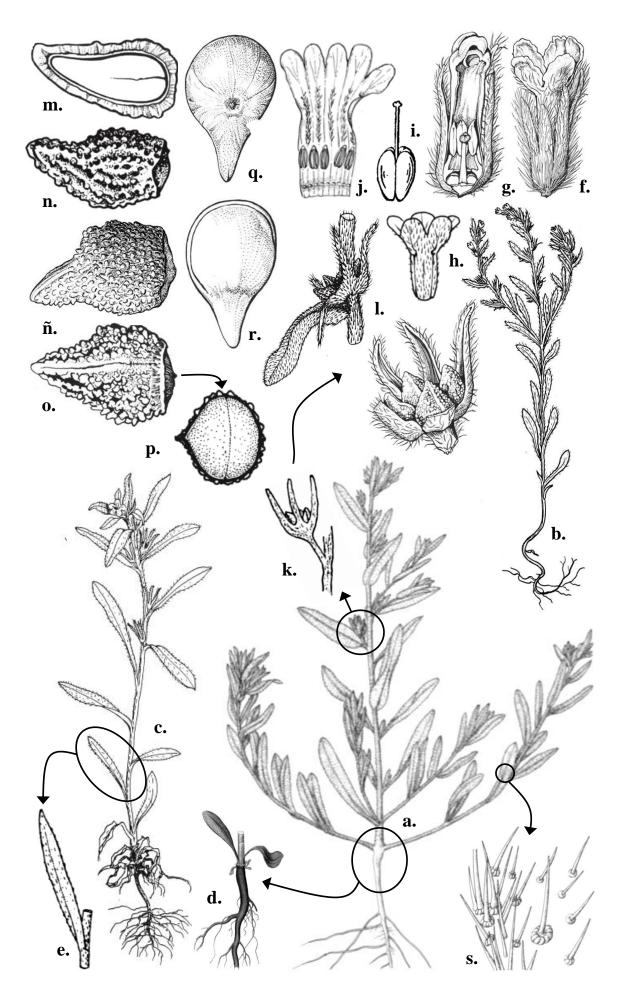


Figura 1.3 *Buglossoides arvensis* L. **a.** Núculas. **b.** Plántula en estado de cotiledón. **c.** Plántula con primer par de hojas. **d.** Plántula en estado vegetativo ramificando desde los nudos. **e.** Sección transversal de un tallo hueco. **f.** Raíz pivotante principal con raicillas laterales. **g.** Tallo floral ramificado de floración acrópeta. **h.** Pequeñas flores gamopétalas apicales. **i.** Núculas madurando provenientes del mismo ovario con el cáliz persistente. **j.** Plantas al momento de cosecha encontrándose la mayoría de las hojas secas y caídas.



María de las Mercedes Longás

Figura 1.4 Morfología de *Buglossoides arvensis*. a. Porte semiarbustivo, planta ramificada desde la base. b. Planta erecta de ramificación apical. c. Planta sin ramificaciones con floración basípeta. d. Cuello con hojas más antiguas en la parte apical y la raíz pivotante en la basal. e. Hoja sésil entera, oblongo-lanceoladas a linear. f. Cáliz y corola. g. Corte longitudinal de la flor hermafrodita. h. Corola gamopétala sub-infundibuliforme. i. Ovario súpero tetralobulado. j. Cara interna de la corola presentando las 5 líneas longitudinales de pelos. k. Pedúnculo, inserción en el tallo sosteniendo las 4 núculas. l. Cáliz persistente. m. Núcula, corte lateral exhibiendo el pericarpio, la testa y el embrión. n. Núcula, cara lateral. ñ. Núcula cara dorsal. o. Núcula cara ventral con la unión carpelar visible. p. Núcula, corte transversal. q. Embrión con testa. r. Embrión. s. Detalle de la pubescencia foliar, base uniseriada. (Adaptado de Cecchi *et al.*, 2014; Retief & Van Wyk, 2002; Zippel & Wilhalm, 2003. Páginas de internet: 8).

1.1.3 Descripción fenológica

Buglossoides arvensis es una especie dicotiledónea anual, otoño-invernal y terofítica: atraviesa el verano como semilla. El patrón de emergencia a campo en el SO de la provincia de Buenos Aires muestra un comportamiento típico de una especie anual facultativa de invierno, mostrando una cohorte preeminentemente otoñal (mediados y fines de otoño) y una segunda cohorte de menor magnitud hacia principios de primavera.

En la cohorte otoñal, la fase vegetativa inicial se caracteriza por el estado de roseta, típico de la estación invernal en la cual se produce un efecto vernalizante (acumulación de horas de frío) que favorece la subsecuente elongación del tallo principal y la generación de abundantes tallos secundarios. La fase reproductiva se inicia a mediados de la primavera con la floración de las yemas basípetas, la cual continúa en forma ascendente. Al igual que numerosas especies (Schaal, 1980; Wulff, 1986a; Baloch *et al.*, 2001) *B. arvensis* presenta crecimiento acrópeto indeterminado. Es decir, la planta seguirá elongando sus tallos y produciendo flores secuencialmente por varios días e incluso semanas, mientras las condiciones ambientales se lo permitan. El aborto de semillas es raro y si sucede es en las semillas más pequeñas que se han desarrollado finalizando la estación favorable.

El momento de cuaje y la duración de la fase de maduración de los frutos en las plantas madre, ocurre en distintos momentos observándose diferencias entre las cohortes de otoño y primavera. Esta última muestra una rápida inducción floral con un desarrollo vegetativo exiguo. En general, florece desde principios de primavera a mediados de verano (Marzocca *et al.*, 1993) madurando los frutos a las 3-4 semanas. Las fechas de estos procesos dependerán de la fecha de emergencia y las condiciones ambientales imperantes.

De lo anterior se deduce que los individuos de emergencia otoñal son los que presentan mayor capacidad competitiva, de importancia al encontrarse como maleza en cereales de invierno. Además, poseen una elevada probabilidad de generar abundante cantidad de propágulos dada la

mayor duración de las etapas ontogénicas. Una vez en el banco de semillas, la vida media de las semillas es de tres años (Bischoff, 2005).

1.1.4 Hábitat

Buglossoides arvensis habita zonas templadas a semi-áridas (Buckley, 1981). Prefiere suelos arenosos (Marzocca et al., 1993) de pH neutro a ligeramente alcalino, frecuentando suelos calcáreos o calizos (Lang et al., 2016). Se distingue en terrenos bien drenados (Cumberford & Hebard, 2015; Manthey et al., 2006) e incluso secos.

López Pulido *et al.* (1988) la específican como especie nitrófila y Lorite *et al.* (2002) y Sanz (1988) describen su hábitat como pastizales nitrificados o ligeramente nitrificados. Lang *et al.* (2016) lograron producir altas cantidades de semillas de la especie en suelos bajos en recursos minerales, siendo a su vez encontrada en suelos pobres en muchos lugares (Meyer & Mahn, 2006).

Generalmente es hallada en aéreas disturbadas, rastrojos, cultivos abandonados, praderas con influencia antropológica, a la vera de caminos o vías de ferrocarril, basurales o en sitios exhibiendo signos de disrupción física siendo considerada una especie "ruderal" (Tafra *et al.*, 2012; Hoagland & Buthod, 2005; Retief & Van Wyk, 2002; Leidolf & McDaniel, 1998; Marzocca *et al.*, 1993; López Pulido *et al.*, 1988; Garrett, 1913).

1.1.5 Origen y distribución

Buglossoides arvensis es una especie cosmopolita originaria de Eurasia que actualmente se encuentra distribuida por todo el mundo. Dado que la diseminación es de corta distancia, la introducción de *B. arvensis* a los diferentes países se efectuó principalmente junto a granos de cereales, especialmente trigo (Asav & Kadioğlu, 2014; Milanova *et al.*, 2007; Bonn, 2005; Retief & Van Wyk, 2002). Si bien su poder invasivo es bajo, se encuentra naturalizada (establecida) en la mayoría de los países donde es introducida sin representar amenaza para la vegetación nativa (Weigend & Alvarez, 2014).

1.1.5.1 Distribución mundial

Tanto en el viejo continente como en el este asiático (sitio de origen), el nombre *B. arvense* se encuentra en casi todas las listas botánicas de los diferentes países. En el mapa (Figura 1.5) puede apreciarse su distribución hacia el norte del continente africano como hacia el resto de Asia, Oceanía e incluso Europa.

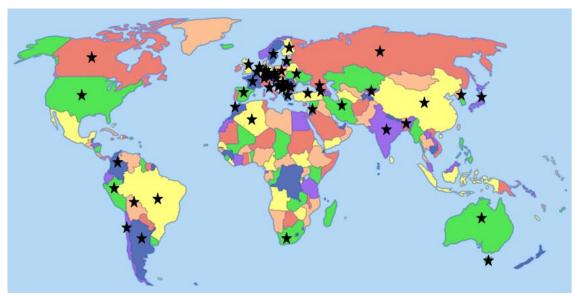


Figura 1.5 Países (★) donde se cita la presencia de *Buglossoides arvensis* (ANEXO I).

1.1.5.2 Distribución local

En Argentina se encuentra citada como maleza en la región de Bahía Blanca (Lamberto *et al.*, 1997; Chantre, 2010). Un relevamiento realizado por Scursoni *et al.* (2014) sobre las comunidades de malezas de la provincia de Buenos Aires indica una constancia (Ci) de 12% para *B. arvensis* en la región del sudoeste de la provincia. Gigón *et al.* (2008) durante las campañas de trigo 2006/07 y 2007/08, determinaron distinta frecuencia de aparición en los partidos de la región, siendo en orden decreciente Ci = 52,6; 16,7; 12,8; 9,8 y 1,9% para Villarino-Patagones, Puán, Bahía Blanca, Guaminí y Sierra de la Ventana, respectivamente. Asimismo, determinaron que los mayores niveles de infestación observados en lotes de trigo corresponden a los partidos de Puán y Bahía Blanca, mientras que en Villarino y Patagones la severidad de las infestaciones resultaban bajas a moderadas (Figura 1.6).



Figura 1.6 Distribución de *Buglossoides arvensis* (= *Lithospermum arvense*) en las distintas zonas agroecológicas del sudoeste de la provincia de Buenos Aires (Adaptado de Chantre, 2010).

1.1.6 Buglossoides arvensis como maleza problemática

Buglossoides arvensis es maleza en cultivos de tubérculos y raíces, colza (Mikhailova et al., 2015), azafrán (Nehvi et al., 2006), mostaza, lenteja (Nasir & Sultan, 2002) pero principalmente en cereales de invierno (Georgiev & Delchev, 2016; Milanova et al., 2007; Bükün, 2004; Marzocca et al., 1993).

Como la mayoría de las malezas presentes en cultivos, compite por los recursos causando mermas en los rendimientos y pérdida de calidad comercial. El impacto es mayor si la emergencia de *B. arvensis* es temprana (Irassar, 2008). Es una impureza común en semillas de trigo (Gökalp & Üremiş, 2015), centeno y trébol interfiriendo en la comercialización por aparecer como "cuerpos extraños" (Marzocca *et al.*, 1993). Una particularidad de la planta es que queda erguida y con sus semillas mayormente prendidas por lo que son cosechadas junto con las de trigo o cebada.

1.1.7 Manejo agronómico de la especie

Décadas atrás, en Europa *B. arvensis* estaba muy presente junto a los sembrados, pero con el uso de herbicidas residuales (especialmente pertenecientes a la familia de las sulfonilureas) y la mejora en el sistema de limpiado de granos, la maleza disminuyó un 63% tanto en frecuencia como en abundancia (Georgiev & Delchev, 2016; Richner, 2014). De esta manera pasó a ser una maleza de "rara presencia" en el continente europeo (Pustovoytov *et al.*, 2010; Bischoff, 2005). En Alemania se atribuye su reducción en número y desplazamiento de áreas cultivadas a marginales, a la veloz intensificación de la agricultura en las últimas décadas del siglo pasado; especialmente a la aplicación de fertilizantes minerales (Baessler & Klotz, 2009).

En la pampa húmeda Argentina, en Dorrego (Buenos Aires) sucedió el mismo fenómeno. La cantidad de *B. arvensis* disminuyó en un 80% en sembrados de trigo debido a que a fines de la década de los 80 se comienza a utilizar metsulfuron y otros herbicidas pertenecientes al grupo de las sulfonilureas (Istilart & Yanniccari, 2013).

Sin embargo, en el sudoeste bonaerense, se produjo un incremento de la especie debido a la adopción de la siembra directa. A su vez, debe considerarse que *B. arvensis* emerge óptimamente en el estrato de suelo cercano a la superficie (Chantre *et al.*, 2009a), por lo que en sistemas con nula o baja labranza del suelo se vería favorecida su emergencia. Bajo escenarios similares, se describe en el viejo continente la misma tendencia en la especie: empezar a hacerse visible bajo la implementación de la labranza mínima (Woźniak, 2012), del uso de siembra directa con glifosato (Woźniak & Soroka, 2015; Hernández Plaza *et al.*, 2010) o en campos con cultivos orgánicos (Stolton & Geier, 2002).

1.1.7.1 Control químico

Ensayos de post-emergencia realizados durante la década del '70, mencionan un efecto sinérgico de bifenox con dicamba + MCPA o solamente dicamba + MCPA resultando en un buen control de la especie (Fua & Mackie, 1981), lo que no se logra aplicando cada herbicida por separado (Marzocca *et al.*, 1993; Rydrych & Whitson, 1984; Fua & Mackie, 1981). Por esos años, también se cita al terbutryn para su control químico en trigo (Rydrych & Whitson, 1984; Reeves, 1981) y diuron, linuron y bromoxinil solo o en mezclas con dicamba y/o MCPA (Rydrych & Whitson, 1984). En 1990 se alcanzó un buen control con piridato disminuyendo la susceptibilidad a medida que la maleza avanza en desarrollo (Seidel & Russell, 1990). Si emerge en cultivos invernales, en el estado de 2-8 hojas se le puede aplicar carfentrazone-ethil en mezcla con MCPA amina (CASAFE, 2015).

En tratamientos de pre-emergencia es susceptible a simazina, atrazina (Marzocca *et al.*, 1993) y fluorocloridona. Este ultimo herbicida aplicado en post emergencia es menos eficaz (Cong *et al.*, 2014). El uso de atrazina en barbechos largos para soja o maíz puede resultar efectivo. Al ser una especie anual y con semillas sin capacidad de desplazarse por el viento es muy importante lograr que no llegue a producir semillas en los cultivos para bajar la incidencia a mediano y largo plazo.

Buglossoides arvensis presenta susceptibilidad a los herbicidas de la familia sulfonilureas, como el metsulfuron y el iodosulfuron, manifestando una mayor respuesta en estados tempranos de activo crecimiento y baja fertilización nitrogenada; al presentar residualidad, estos herbicidas logran controlar los flujos posteriores de emergencia resultado del amplio período de emergencia de la maleza (Brass, 2006; Irassar 2008; Di Lenna, 2012). En 2009 se observaron en China plantas resistentes de *B. arvensis* al tribenuron-methyl (sulfonilureas), perteneciente al grupo B/2 de herbicidas que inhiben la ALS (acetolactatosintetasa); lo que resulta preocupante por el potencial desarrollo de resistencia cruzada a otros herbicidas del mismo grupo (HEAP, 2009).

Si por alguna razón no se realizan los controles en post-emergencia temprana, *B. arvensis* comienza a mostrar menor sensibilidad a dichos herbicidas, principalmente por mayor desarrollo, siendo importante realizar mezclas con herbicidas de acción hormonal como dicamba o aminopiralid. También se ha observado que en condiciones de estrés hídrico el control mejora notablemente con el agregado de 2,4-D o dicamba a las mezclas con sulfonilureas.

En barbechos de cosecha gruesa suele demostrar tolerancia a dosis comerciales de glifosato cuando las aplicaciones se realizan en estadios avanzados de desarrollo de la maleza o en condiciones de estrés hídrico. Además, por la densa pilosidad que tienen sus hojas, la penetración de los herbicidas se restringe fuertemente. Para lograr buenos controles en estas condiciones se sugiere hacer mezclas con herbicidas hormonales y agregar coadyuvantes no iónicos que mejoren la penetración de los herbicidas (e.g., sulfato de amonio, aceite metilado).

1.2 Bioecología del establecimiento de la especie

1.2.1 Dormición

1.2.1.1 Definición

La semilla contiene al embrión, una nueva planta en miniatura equipada estructural y fisiológicamente para su rol de dispersión. Se encuentra bien provista de reservas, aportadas por la planta que le dió origen, para sustentar el crecimiento de la plántula hasta que la misma se establezca y pueda ser autosuficiente como organismo autótrofo. Como su función es dar origen a una siguiente generación, debe asegurarse de hacerlo en el momento adecuado y para eso cuenta con una serie de mecanismos adaptativos.

Una semilla germina cuando recibe algún estímulo externo que le indica que es el momento apropiado para hacerlo. Sin embargo, hay veces que, aún encontrándose en un ambiente adecuado, una semilla viable no lo hace debido a que se halla dormida. Una semilla se encuentra dormida cuando por alguna condición interna, su germinación se ve impedida en circunstancias hídricas, gaseosas y de temperatura adecuadas para hacerlo. La dormición innata poseída por las semillas al momento de su dispersión desde la planta materna es conocida como dormición primaria (Baskin & Baskin, 1998; Benech-Arnold *et al.*, 2000).

La dormición es un atributo seminal que optimiza la distribución de la germinación a lo largo del tiempo en una población de semillas (Bewley, 1997). Mientras la simiente permanezca viable existe la posibilidad de que encuentre para ella la mejor ubicación en tiempo y espacio (Fenner, 1985). Se trata de una estrategia adaptativa de supervivencia muy común en las malezas y de vital importancia en las anuales. Es habitual en semillas de especies anuales que su nivel de dormición sea leve o nulo durante la estación que precede al período de condiciones favorables para el establecimiento de la plántula y posterior desarrollo, induciéndose la dormición previo a la época desfavorable para tal fin (Karseen et al., 1988). Para poder superar la dormición, la semilla debe verse expuesta a alguna "pista ambiental" que active diferentes mecanismos fisiológicos. Por ejemplo, la dormición puede ser quebrada por un período de altas o bajas temperaturas dependiendo de la especie. De esta manera la germinación ocurrirá en la estación adecuada para su subsiguiente crecimiento y desarrollo. Si una planta anual invernal germina inmediatamente al momento de la dispersión de sus semillas en primavera, lo más probable es que les cueste a las plántulas atravesar el verano. De lo contrario, el establecimiento tendrá más chances de ser exitoso en el otoño (Finch-Savage & Leubner-Metzger, 2006; Kermode, 2005). Las semillas perciben la estación del año circundante principalmente a través de variaciones en las temperaturas del suelo (Karssen, 1995).

El clima es un factor impredecible en muchos ambientes, principalmente en zonas áridas y semiáridas donde las precipitaciones tienden a ser muy variables. Como consecuencia, un alto nivel de dormición suele ser una característica común en plantas de estas regiones. Dicha

dormición es probablemente una adaptación para prever una respuesta inmediata ante una lluvia ocasional ocurrida en la estación seca. Una lluvia de bajo milimetraje no va a humedecer de manera eficiente el suelo para el posterior establecimiento y desarrollo de la plántula (Fenner, 1985).

Buglossoides arvensis es una especie facultativa de invierno (Chantre et al., 2009a), por lo que la mayoría de sus semillas germinan en otoño, pero algunas pueden hacerlo en la primavera siguiente a su dispersión, desarrollando luego un ciclo más efímero. Cuando las semillas empiezan a perder la dormición, solo germinan a bajas temperaturas. Pero al continuar perdiendo dormición se amplía el rango térmico en el que pueden germinar. En verano, aún las más bajas temperaturas no son lo suficientemente frías como para permitir la germinación (Baskin & Baskin, 1998).

La salida de la dormición no es necesariamente sinónimo de posterior germinación, pero es un pre-requisito para ella. Muchas veces, es necesaria una experiencia ambiental adicional que actúe como disparador de la germinación. Generalmente se trata de luz o nitratos. De esta manera se promueven flujos de germinación con la labranza, la cual induce la germinación al exponer a las semillas a la luz (Finch-Savage & Leubner-Metzger, 2006; Fenner, 1985). La temperatura regula tanto a la dormición como a la inducción de la germinación, siendo los requicitos de temperatura en cada proceso bastante diferentes (Vleeshouwers et al., 1995). En condiciones naturales son de extrema relevancia las temperaturas alternas para promover la germinación. Temperaturas alternas en *Sisymbrium officinale* estimulan la germinación si la semilla ya superó la dormición, caso contrario promueven la latencia (Vleeshouwers et al., 1995).

Cabe aclarar que una semilla dormida no responderá a dicha señal o lo hará parcialmente (Bradford, 2002). Estas señales no parecen ser necesarias en *B. arvensis* (obs. pers.).

1.2.1.2 Dormición fisiológica

Buglossoides arvensis posee dormición fisiológica leve (Chantre et al., 2009a). Para despertar, las semillas maduras y secas deben pasar por un período de post-maduración en seco (after-ripening). La progresiva salida de la dormición ocurre en función del ambiente y el tiempo, incrementándose la tasa de salida al aumentar la temperatura de una manera predecible (Murdoch & Ellis, 2000). Durante este lapso de tiempo hay cambios en la concentración y sensibilidad hormonal y tratamientos con ácido giberélico pueden romper este tipo de dormición (Finch-Savage & Leubner-Metzger, 2006).

Si bien la germinación de una semilla es un evento dicotómico, la dormición de una población de semillas se manifiesta como un gradiente (máxima a nula dormición) (Finch-Savage & Leubner-Metzger, 2006). Se dice que las semillas en estados intermedios poseen dormición condicional o relativa dado que los rangos de factores ambientales permisivos para la germinación son limitados, es decir, el grado de dormición determina el rango de condiciones en donde una semila puede germinar (Vleeshouwers et al., 1995). La dormición varia en una escala continua y

a medida que se va perdiendo la ventana de germinación va progresivamente ensanchándose (Finch-Savage & Leubner-Metzger, 2006; Vleeshouwers et al., 1995). De los cinco tipos de dormición fisiológica no profunda, *Buglossoides* pertenece al primero en el cual el rango térmico donde la germinación puede ocurrir, aumenta gradualmente de bajas a altas temperatura a medida que la semilla se va despertando (Baskin & Baskin, 1998; Finch-Savage & Leubner-Metzger, 2006).

Estudios han mostrado que los mecanismos moleculares intrínsecos que determinan la dormición fisiológica no profunda tienen un componente embrional y/o relativo a los tejidos que lo rodean (Finch-Savage & Leubner-Metzger, 2006). De esta manera, dicha dormición se clasifica en dos grandes grupos: dormición embrional y dormición de las envolturas embrionales. En la dormición embrional, es el embrión el que está dormido y los ejes embrionales no podrán elongarse aún si se retirasen de los tejidos que los rodean y se colocasen en un medio adecuado. En el segundo caso, la semilla se encuentra dormida, pero es uno o más de los tejidos cobertores (endosperma, perisperma, megatofito, pericarpio y/o testa) los que bloquean la germinación, por ejemplo por restricción mecánica. Por ende, cuando el embrión es aislado, es capaz de germinar y se desarrolla una plántula normal. Como pre-requisito para permitir la germinación, el potencial de crecimiento del embrión debe aumentar y/o la barrera mecánica que ofrecen los diferentes tejidos debe ser atenuada. Por acción de hidrolasas (de origen endospermático y/o embrional) las paredes celulares, especialmente de la región micropilar, son debilitadas disminuyendo la fuerza requerida por la radícula para atravesarla. Cabe destacar que estos dos tipos de dormición son componentes de la dormición fisiológica. Diferentes grados de ambos pueden existir simultánea o sucesivamente, siendo su suma o interacción lo que determina el grado de dormición (Kermode, 2005; Finch-Savage & Leubner-Metzger, 2006).

1.2.1.3 Regulación hormonal

Las hormonas de las plantas son un grupo de sustancias orgánicas producidas naturalmente que influencian a bajas dosis procesos fisiológicos, principalmente vinculados al crecimiento, diferenciación y desarrollo. La síntesis de hormonas puede ocurrir en muchos tejidos e incluso en células dentro de los tejidos. Su acción puede ser ejercida a distancias largas, cortas o en el lugar de origen (Davies, 2005).

El modo en que una hormona influencia un proceso depende de (Davies, 2005):

- 1) La cantidad presente de hormona: regulado por la biosíntesis, degradación y conjugación.
 - 2) La localización de la hormona: afectado por su movimiento o transporte.
- 3) La sensibilidad hacia la hormona por parte del tejido: involucra la presencia de receptores y cadenas de compuestos de señalización-transducción.

La respuesta hacia las hormonas puede cambiar durante el desarrollo consecuencia de razones genéticas o por variaciones ambientales, actuando estas últimas como pistas para el desarrollo (Davies, 2005).

La biosíntesis de las hormonas involucra una serie de pasos que convierten intermediarios con poca o nula actividad biológica en la forma activa. Usualmente cada paso es catalizado por una enzima que es, a su turno, codificada por un gen llamado "Gen de síntesis". La expresión de estos genes o el tiempo en que son transcriptos es afectada por las condiciones ambientales como por el nivel de otras hormonas. Estos factores interactúan fuertemente con el proceso de biosíntesis hormonal afectando todo el fenotipo (Reid, 2005).

Los eventos primarios en la salida de la dormición se inician con la recepción de estímulos por el embrión y la transducción de señales inmediatas que conducen a los eventos secundarios que involucran cambios hormonales y en el metabolismo (Bewley, 1997). En la inducción, mantenimiento y superación de la dormición interactúan muchos factores químicos y ambientales cobrando un rol fundamental la parte hormonal. Si bien se sabe que son muchos los reguladores involucrados en estos procesos, el ácido abscísico (ABA) y el giberélico (GA) son los principales (Figura 1.7). El nivel de dormición impuesto en los embriones inmaduros parece ser el resultado del balance hormonal entre las acciones del ABA y el GA (Steinbach *et al.*, 1997). A su vez, es la relación entre ambas sustancias la que determinaría la evolución de la dormición. Un radio ABA:GA alto mantiene la dormición mientras que uno bajo la remueve. Esto último resulta de una mayor biosíntesis de GA y degradación de ABA (Finch-Savage & Leubner-Metzger, 2006). Sin embargo, no solo la cantidad de cada hormona es válida en la regulación de estos procesos, también hay que considerar la sensibilidad hacia ellas como la percepción por parte de los receptores (Finch-Savage & Leubner-Metzger, 2006).

Figura 1.7 Estructura química de las fitohormonas: **a.** Ácido giberélico (GA₃). **b.** Ácido abscísico (ABA).

El ácido abscísico deriva de los carotenoides y es sintetizado a partir del gliceraldehido-3fosfato vía isopentenyl difosfato y carotenos en raíces, hojas maduras y semillas (Davies, 2005). Esta hormona, regula muchos procesos durante el ciclo de vida de una planta. Entre los mismos se incluyen eventos claves en la formación de las semillas: la deposición en el almacenamiento de reservas, la prevención de la germinación precoz, la adquisición de la tolerancia a la desecación y como se mencionó, la inducción a la dormición primaria (Kermode, 2005; Davies, 2005). A su vez, en semillas maduras y embebidas, es el principal responsable de la superación o mantenimiento del estado de dormición (Arc *et* al., 2013; Holdsworth, 2008), para lo último es necesaria su síntesis *de novo* (Kermode, 2005). Se sugiere que la participación del ABA en la dormición se debe a su regulación en la expresión de ciertos genes (Karsen, 1995).

En los primeros estadios del desarrollo seminal, los niveles de ABA son bajos. Se incrementan antes de mitad de desarrollo, momento en que se empiezan a sintetizarse las reservas, para luego declinar durante la maduración y secado (Figura 1.10). En *Helianthus annuus*, la dormición embrional es establecida justo después del pico de ABA, en el momento en que el nivel de dicha hormona comienza a declinar (Le Page-Degivry *et al.*, 1990). Diferentes especies muestran variaciones en el momento de inicio de la dormición, siendo también influenciado genética y ambientalmente (Kermode, 2005). Durante este período también se reduce la sensibilidad del embrión al ABA (Bewley, 1997). La dormición es impuesta únicamente por el ABA producido por el embrión sin ser influenciada por el ABA materno (Le Page-Degivry & Garello, 1992). Sin embargo, tanto los tejidos que rodean a la semilla como la planta madre juegan un importante rol en el mantenimiento o en el fomento de la biosíntesis de ABA en el embrión en desarrollo (Kermode, 2005).

El rol del ABA implica acciones a diferentes niveles: transcripción, procesamiento de ARN, modificación de proteínas y metabolismo de mensajeros secundarios. El proceso se inicia con la recepción de la hormona en un receptor específico (tanto en la cara externa como intracelular del plasmalema) desencadenando la transducción de una secuencia de señales que involucran proteínas intermediarias y mensajeros secundarios. Se trata de una red de señalización dado que compromete la interacción de varios componentes. El proceso finaliza con la regulación y expresión de genes, como ser aquellos vinculados en el mantenimiento o la terminación de la dormición (Kermode, 2005).

Una de las maneras en que el ABA previene la germinación en algunas especies es inhibiendo el crecimiento de la radícula. Se da posiblemente por inhibir la toma de agua, principalmente en condiciones de estrés hídrico (Baskin & Baskin, 1998).

Resumiendo, los cambios en la concentración del ABA tanto en los embriones como en los tejidos circundantes contribuyen a la fijación, mantenimiento y terminación de la dormición. Los niveles de ABA y sus catabolitos varían dada la constante biosíntesis y degradación que sufren. Por lo tanto, los cambios en el estatus de la dormición están más relacionados a la capacidad de biosíntesis *versus* catabolismo que al nivel de ABA *per se* (Kermode, 2005).

El ácido giberélico, no parecería estar involucrado en el control de la dormición por sí mismo, cobrando importancia en la promoción y mantención de la germinación. De esta manera,

actuaría una vez que las inhibiciones a causa del ABA hayan sido superadas (Bewley, 1997). Es decir, cuando se encuentre en concentraciones suficientes para promover la germinación y la biosíntesis de ABA se halle inhibida (Finch-Savage & Leubner-Metzger, 2006). Luego del *after-ripening* hay un incremento en la sensibilidad hacia los factores que estimulan la germinación, como el GA, que a su vez se ve incrementada su síntesis (Karssen, 1995).

Las actividades del ABA y el GA se encuentran enlazadas, el GA contrarrestaría el efecto inhibitorio del ABA, frecuentemente en combinación con las citoquininas (Bewley, 1997).

Por lo menos se han propuesto dos roles que ejerce el GA para estimular la germinación. Por un lado, esta hormona es necesaria para superar la restricción mecánica conferida por los tejidos que rodean el embrión, como ser la aleurona y la testa. Por otro lado, el GA incrementaría el potencial de crecimiento del embrión.

1.2.1.4 Modelización de la germinación

1.2.1.4.1 Modelos poblacionales basados en umbrales térmicos

La comprensión de la dinámica poblaciónal de las malezas es clave para optimizar su control. El estado crítico, en su ciclo de vida, es el de plántula dada su mayor vulnerabilidad. Por esta razón se hace necesario predecir su ocurrencia en tiempo y espacio (Benech-Arnold & Sánchez, 1995). Los modelos poblacionales tienen el potencial de cuantificar y predecir respuestas ecofisiológicas. Se basan en el tiempo biológico en donde el progreso del fenómeno estudiado es acorde a las condiciones ambientales (Finch-Savage & Leubner-Metzger, 2006).

Aún en los lotes de semillas que aparentan uniformidad al germinar, suele existir una variación individual con respecto al grado de dormición, siguiendo una distribución normal en la población. La variación en el porcentage de germinación, en función de los tratamientos que rompen con la dormición, usualmente se aproximan a una frecuencia de distribución normal acumulada. Como cualquier distribución normal, puede ser descripta en términos de media y varianzas (Murdoch & Ellis, 2000).

La temperatura es el factor básico que influencia el curso de la vida, específicamente la tasa de cambio del tiempo fisiológico. La temperatura puede determinar la fracción de una población que se encuentra en estado de dormición y al mismo tiempo modular la germinación de las semillas quiescentes. Por lo tanto, el ambiente termal podrá modificar el nivel de dormición estableciendo los cambios en los patrones estacionales de dormición. Una vez que la semilla se encuentra despierta, en el rango termal donde la germinación se maximiza, las simientes responden a la temperatura variando su tasa de germinación (Benech-Arnold & Sánchez, 1995).

El tiempo térmico o constante termal (θ) es una medida del tiempo biológico en las especies poiquilotermias (aquellas cuya temperatura corporal es idéntica a la de su ambiente) ampliamente utilizada para describir la germinación en el tiempo en diferentes especies. La mayoría de las especies están adaptadas a un rango de temperatura que influencia fuertemente su distribución.

Dentro de este rango se encuentran las tres temperaturas cardinales que caracterizan la respuesta de la germinación a la temperatura: mínima, óptima y máxima. La mínima (o base, T_b) y la máxima (T_m) son temperaturas por debajo o arriba de las cuales la germinación no ocurre y la tasa equivale a cero, mientras que la óptima (T_o) es la temperatura donde la germinación es más veloz. Por lo tanto, partiendo de T_b , a medida que aumenta la temperatura ambiental (T) también lo hará la tasa de germinación hasta llegar a T_o . A partir de allí, si la temperatura sigue incrementándose, la tasa de germinación caerá (Trudgill et al., 2005; Bradford, 2002).

El tiempo térmico es expresado en grados-días (°C.d), necesarios para que el desarrollo de un proceso se complete a cualquier temperatura dentro del rango T_b - T_o . Habiendo calculado θ y T_b la tasa y la duración de la germinación puede calcularse para cualquier temperatura (Trudgill *et al.*, 2005).

Dado que la germinación simultánea de una población de semillas no ocurre, sino que se prolonga en un período de tiempo; las relaciones lineales asumidas, de ahora en mas, corresponden a una fracción determinada de la población (Washitani, 1987).

Mientras otros factores ambientales no sean limitantes, el tiempo biológico necesario por una fracción de semillas para germinar, puede ser cuantificado por la suma T que excede T_b en un período de tiempo. De esta manera, el tiempo térmico resulta de la suma de este valor al correr de los días acumulándose grados-días (Finch-Savage & Leubner-Metzger, 2006).

$$\theta_g = (T - T_b) t_g \tag{1}$$

Donde θ_g es el tiempo térmico para completar la germinación de una fracción g de la población y t_g es el tiempo para completar la germinación de dicha fracción g, cuantificado en días o en horas.

En general, entre las semillas despiertas dentro de una población existe una pequeña variación en T_b la cual sigue una distribución normal, sin embargo, en la mayoría de los modelos predictivos suele considerarse constante para toda la población. En un determinado momento, una fracción de semillas (g) pertenecientes a una población, requieren cierto tiempo térmico para germinar (θ_g) (eq. 1). Por lo tanto, distintas fracciones de semillas de dicha población requieren diferentes tiempos termales para completar la germinación (Figura 1.8i) (Bradford, 1995). La temperatura base, no solo que es considerada la misma para toda la población, sino que se mantiene constante en el tiempo, es decir que a medida que transcurre la post-maduración y las semillas se van despertando la misma no varía, pero si lo hace el tiempo térmico dentro de cada fracción de semillas (Chantre et al., 2009b).

La tasa de la germinación se define como la reciproca del tiempo que es necesario para germinar (Washitani, 1987) y es determiada por la diferencia entre las condiciones ambietales de un determinado factor, como ser la temepratura, y un nivel base de dicho factor en el cual a germinación no se completa. La misma puede ser descripta en función de uno o mas factores ambientales de manera lineal (Finch-Savage & Leubner-Metzger, 2006).

En el rango sub-óptimo de temperaturas para germinar, entre T_b y T_o , la tasa de germinación (r) se obtiene al aplicar la reciproca (1/t) al tiempo que le lleva a cierta fracción de la población (g) germinar. Usualmente, la tasa mantiene una relación casi lineal con la temperatura (Figura 1.8). La ecuación que describe dicho comportamiento es la siguiente (Washitani, 1987):

$$r_g = \frac{1}{t_g} = \frac{1}{\theta_g} \left(T - T_b \right) \tag{2}$$

Dado que T_b es similar para todas las semillas en una población, al graficar $r_{(g)}$ versus T, las diferentes fracciones de la población interceptaran al eje X (T) en un punto en común (Figura 1.8). Sin embargo, es común observar que diferentes fracciones de semillas posean diferentes valores de T_m (Figura 1.8ii), el cual a su vez varia a medida que la semilla acumula horas de calor. En el rango supra-óptimo de temperaturas, $r_{(g)}$ disminuye conforme va aumentando la temperatura siendo la pendiente de dicha curva ($1/\theta_{Tm}$) la misma para todas las fracciones de semillas. Estas líneas interceptarán al eje de temperatura en diferentes valores de T_m (Bradford, 2002).

$$\theta_{Tm} = (T_{m(g)} - T)t_g$$
 [3]

$$r_g = \frac{1}{t_g} = \frac{(T_{c(g)} - T)}{\theta_{Tm}} \tag{4}$$

Para las especies en las que la temperatura es el principal factor que influencia los cambios en la profundidad de la dormición, estos modelos pueden ser empleados para determinar el momento de la germinación (Finch-Savage & Leubner-Metzger, 2006) y poder comparar los parámetros entre subpoblaciones.

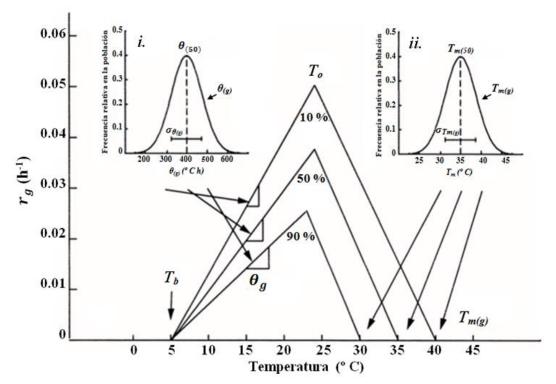


Figura 1.8 Relación entre la tasa de germinación y la temperatura. A temperaturas sub-óptimas la tasa de germinación ($r_{(g)} = 1/t_g$), para las diferentes fracciones (porcentajes) de semillas dentro de la población, aumenta linealmente con la temperatura partiendo de una temperatura base (T_b)

común. Las pendientes de las lineas equivalen a la inversa del tiempo termal requerido para germinar $(1/\theta_{T(g)})$, el cual varía entre semillas individuales sigiendo una distribución normal (gráfico anidado i.). La tasa máxima de germinación ocurre a la temperatura óptima (T_o) decreciendo linealmente por debajo de ella. La temperatura máxima de germinación $(T_{m(g)})$ varía entre fracciones de semillas siguiendo una distribución normal (gráfico anidado ii.) (Adaptado de Bradford, 2002).

1.2.1.4.2 Curvas de dosis-respuesta

La curva de dosis-respuesta es una forma simple para cuantificar la sensibilidad de una población de individuos a una sustancia, como ser la respuesta ante la aplicación de un herbicida. La comparación de sensibilidades, o cualquier relación cuantitativa (desde rasgos morfológicos hasta fisiológicos como ser la germinación) ante sustancias diferentes puede hacerse contrastando dos o más curvas. No es más que un análisis de regresión donde a través de una ecuación, que se ajusta bien a los datos, se predice el comportamiento de una población a dosis crecientes de una droga.

Se trata de un análisis log-logístico que provee estimaciones confiables a lo largo de todo el rango de dosis evaluado, aún en las extremas. En el caso de ser utilizado para estudiar el comportamiento de la germinación, se podrá estimar ante una dosis dada de principio activo el porcentaje de semillas que germinarían en una población.

La típica curva de dosis-respuesta posee forma sigmoidea (Figura 1.9). La expresión matemática que relaciona la respuesta y a la dosis x es:

$$y = f(x) \frac{D - C}{1 + \left(\frac{x}{I_{50}}\right)^b}$$

$$= C + \frac{D - C}{1 + 10^{\{b[\log(x) - \log(I_{50})]\}}}$$
[5]

Donde C = límite inferior, D = límite superior, b = pendiente e I_{50} = dosis donde se obtiene el 50% de respuesta.

Una de las ventajas de utilizar la curva de la ecuación 5 es que los parámetros poseen significado biológico. El límite superior (D) corresponde a la media del control y el límite inferior C es la respuesta promedio a dosis muy altas (este parámetro no es necesariamente igual a cero). El parámetro b describe la pendiente de la curva alrededor del I_{50} . Cuanto mayor sea el valor de b más empinada será la pendiente de la curva. La dosis que causa el 50% de respuesta es llamada I_{50} . Esta dosis es la más apropiada para comparar la sensibilidad de un individuo ante diferentes sustancias. Comparar dosis que causen una respuesta mayor, como ser el I_{90} , está sujeto a mayores errores a menos que el ensayo se encuentre diseñado exclusivamente para eso.

Generalmente, se utiliza una escala logarítmica para la dosis de principio activo, la variable independiente (eje X). La variable dependiente (eje Y), el porcentaje de respuesta, suele graficarse

en escala lineal. Hay que considerar el uso de un amplio rango de dosis para poder cubrir todo el espectro de respuestas.

Si se poseen más de una curva de dosis-respuesta, puede surgir la iniciativa de saber si son paralelas, es decir si tienen la misma pendiente. La comparación de dichos parámetros se realiza mediante un *F*-test (Seefeld *et al.*, 1995).

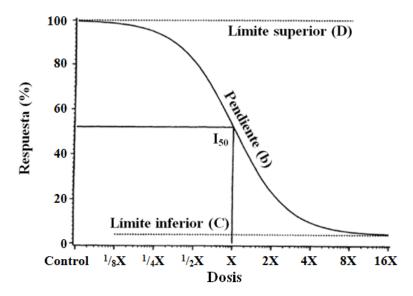


Figura 1.9 Curva de dosis-respuesta log-logística correspondiente a la ecuacion 5. Los valores de los parámetros en este ejemplo son: D=100, C=4, I_{50} = 1 y b=2. El control corresponde a una dosis igual a cero (adaptado de Seefeld et al., 1995).

1.2.2 El proceso de germinación

Una vez que la semilla superó los riesgos y etapas vinculados con su maduración, dispersión y dormición, se encuentra lista para germinar, pero para hacerlo debe percibir las pistas ambientales que le garanticen que el ambiente es el apropiado. Es decir, que la semilla debe reconocer que el sitio es potencialmente seguro, lo cual va a depender también de las condiciones post-germinación. Las semillas solo pueden responder a las condiciones actuales por lo que la selección debe haber obrado en cada especie para reaccionar ante una combinación de factores para germinar que posean una gran probabilidad de estar seguidos por otra combinación de factores favorables para el establecimiento. Aunque esta combinación entre los factores pre y post-germinativos nunca sea perfecta, debe tener la probabilidad de ocurrencia lo suficientemente alta para que las plantas puedan explotarlos (Fenner, 1985).

Para que una semilla seca y quiescente germine deben ocurrir una serie de eventos que comienzan con la imbibición y finalizan con la elongación de los ejes embrionales. El proceso involucra reactivación de la actividad metabólica, rediferenciación de los tejidos embrionales para movilizar las reservas que almacenan y actividad meristemática que resultara en el crecimiento. Debido a que la terminación de la germinación resulta en la pérdida de tolerancia a la desecación,

este paso constituye un compromiso con el origen de la siguiente generación. En consecuencia, la transición de semilla a plántula es altamente sensible a muchos factores ambientales, incluyendo la luz, la temperatura y la disponibilidad de agua. La respuesta a muchos de estos factores ambientales es mediada o interactúa con la señalización mediante una o más hormonas (Finkelstein, 2005).

El fenómeno de la germinación se hace visible cuando la radícula traspasa las estructuras que rodean al embrión (testa, endosperma y, en el caso de Buglossoides por ser un fruto uniseminado, también el pericarpio). En las semillas con envolturas permeables, la toma de agua suele ser trifásica (Figura 1.10). Durante la fase pre-germinativa o fase I la imbibición es veloz dado el fuerte gradiente osmótico entre la semilla quiescente ($\psi = -350 \text{ a } -50 \text{ MPa}$) y el medio (ψ = -2 a 0 MPa), aunque la tasa estará influenciada por la permeabilidad de las cubiertas, la conductividad hidráulica del medio y la superficie de contacto semilla/sustrato. Se trata de un fenómeno principalmente físico que involucra liberación de gases y cambios en la temperatura. El mismo tiene lugar tanto en semillas viables como en no viables. En este período ocurren perturbaciones estructurales temporales, especialmente en las membranas. Por este motivo se produce la fuga de solutos y metabolitos de bajo peso molecular al medio externo; evento que cesa en un lapso corto de tiempo, al restaurarse las membranas. También se activan enzimas reanudando la actividad metabólica como la respiración y síntesis de proteínas. El embrión posee ARNm pre-formado y proteínas que ya no cumplen ninguna función, por lo que son degradadas con la subsiguiente codificación de las moléculas necesarias en la germinación. Hay reparación de ADN (dañado durante los ciclos de secado y rehidratación), síntesis de ADN mitocondrial y uso de reservas (Macovei et al., 2016; Bewley, 1997; Bradford, 1995).

Al ir aumentando el potencial agua (ψ) de la semilla, la toma de agua decrece y el nivel de agua alcanza asintóticamente un nivel de *plateau*: la fase II. Aquí, en semillas viables, continua la activación enzimática y los procesos metabólicos, como la reparación de las membranas y del ADN, el inicio de la síntesis de proteínas y la actividad mitocondrial, impulsando la aparición de la radícula al final de esta fase.

La ocurrencia de la última fase (III) solo sucede si se completa la germinación, caracterizándose por una progresiva división y elongación celular. Se observa nuevamente una acelerada toma de agua asociada a la elongación de los ejes embriónarios. La extensión de la radícula es un proceso impulsado por cambio en los potenciales osmóticos y requiere del ablandamiento de las paredes de las células situadas en los ejes radicales del embrión, aquellas que yacen entre la cofia radical y la base del hipocótile (Macovei *et al.*, 2016; Bewley, 1997; Bradford, 1995).

Para que la germinación sea completa, es necesaria la reducción de la resistencia mecánica de las estructuras que envuelven al embrión. Por lo cual debe haber una degradación enzimática de las paredes celulares llevada a cabo por hidrolasas como ser las hemicelulasas. La primera

zona en mostrar actividad enzimática es la región micropilar para luego, una vez avanzada la germinación, diseminarse por el resto del endosperma. Diferentes zonas han mostrado producir diferentes isómeros de la misma enzima (Bewley, 1997). La expresión de genes que codifican para la síntesis de expansinas es regulada positivamente por el GA (Cho & Cosgrove, 2005).

A su vez, para abastecer de energía a la plántula naciente los productos de reserva deben ser movilizados. En algunos casos, la hidrólisis de macromoléculas de reserva incluye no solo almidón, proteínas y aceites dentro de la célula, sino también polímeros extracelulares como los polisacáridos de las paredes celulares. Aquí también participa activamente el GAs (Davies, 2005).

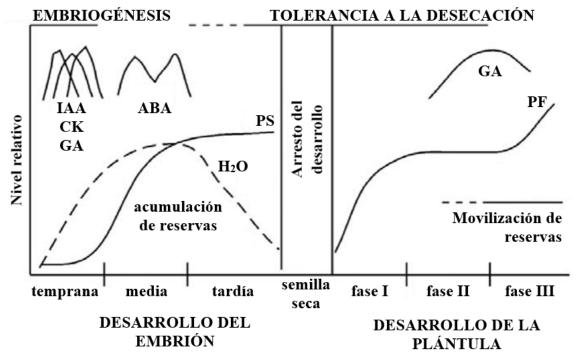


Figura 1.10 Gráfico generalizado mostrando los niveles relativos de agua (----), peso seco y fresco (PS y PF) y hormonal en cada estado de desarrollo del embrión y de la plántula. Con arresto del desarrollo se refiere al estado de quiescencia o dormición (Adaptado de Finkelstein, 2005).

La síntesis de ácido giberélico es central en la cadena de transducción de señales que conduce a la germinación. Las giberelinas (GAs) son una familia de ácidos tetra-cíclicos diterpenoides basados en la estructura del *ent*-gibberellane. Existen 128 compuestos identificados en plantas vasculares, cuatro sintetizados por hongos y cuatro por bacterias. Las GAs derivan del glyceraldeido-3-fosfato vía isopentil difosfato y son elaboradas en tejidos jóvenes y semillas en desarrollo. A cada sustancia se le asigna un número en orden cronológico de identificación. De los 136 GAs conocidos solo algunos presentan actividad biológica. Entre otras formas bioactivas se incluyen GA₃, GA₄, GA₅, GA₆, y GA₇. La(s) GA(s) bioactiva(s) presente(s) en una planta determinada se encuentra(n) acompañada(s) por una docena o más GAs que son inactivas, potenciales precursores o productos desactivados de las formas activas. Las GAs en su esqueleto

pueden contener 20 o 19 carbonos habiendo estas últimas perdido un C metabólicamente. Ambas estructuras pueden sufrir modificaciones como ser la inserción de un grupo funcional cuya posición y estereoquímica influirá fuertemente en la actividad biológica. Los C₂₀-GAs normalmente no son activos, pero pueden metabolizarse a C₁₉-GAs para serlo. En la mayoría de las plantas GA₁ es la molécula activa principal. El ácido giberélico (GA₃), común en muchas plantas, es también producido por el hongo *Gibberella fujikuroi* siendo el GAs de mayor disponibilidad en el mercado (Sponsela & Heddenb, 2005).

Entre los sitios donde se realiza la biosíntesis de GA se encuentran las semillas, donde la producción es específica de un estado determinado y se efectúa en regiones de tejidos vegetativos con gran velocidad de crecimiento. Estudios genéticos determinaron que la expresión de los genes para sintetizarlas parece estar localizada en células y tejidos que responden a la hormona, o muy cerca de ellos (Sponsela & Heddenb, 2005).

A su vez, la acción de dicha hormona requiere de receptores que se supone que se encuentran ligados a las membranas cuya sensibilidad es aumentada por diferentes factores como la temperatura y/o luz. La germinación se encontrará restringida a períodos donde los receptores se encuentren disponibles o activos (Karssen, 1995).

Las semillas pueden permanecer en la segunda fase por mucho tiempo: meses o incluso años. Durante este período, pueden tolerar la deshidratación, incluso ciclos de hidratación seguidos de sequía. Esta habilidad es perdida una vez que se inició el crecimiento del embrión, por lo que ante una falta extrema de agua, la supervivencia se verá complicada. De esta manera, a la semilla embebida le surge una crítica decisión, si permanecer en fase II o iniciar la germinación, fase de la que no hay retorno (Bradford, 1995).

Una forma de evitar que lo anterior ocurra es inhibiendo la síntesis *de novo* de enzimas que son necesarias para la movilización de reservas durante la germinación. La inducción de las mismas puede ser bloqueada por el ABA, producido en respuesta del potencial osmótico o una situación de estrés (Finkelstein, 2005).

1.2.3 Emergencia y estado de plántula

La plántula representa el estadío final de regeneración desde una semilla. El lapso de tiempo comprendido entre la germinación y el establecimiento de una planta joven es el más vulnerable en el ciclo de vida de una planta. La alta mortalidad al estado de plántula actúa como un filtro selectivo de gran peso sobre las características tanto de las semillas como de las plántulas mismas. De este modo, la significancia adaptativa de varios atributos de las semillas se encuentra íntimamente ligado con el éxito de las plántulas para establecerse. Estos rasgos pueden ser interpretados como mecanismos que detectan "el agujero", tanto en tiempo (germinación) como

en espacio, para incrementar la supervivencia y el crecimiento de la futura planta (Kitajima & Fenner, 2000).

El estadio de plántula se inicia con la salida de la radícula por las cubiertas protectoras y se puede definir como el período en el cual la pequeña planta todavía depende de las reservas de la semilla. Es difícil establecer el momento en que deja de ser plántula dado que se va volviendo autótrofa gradualmente y la transferencia de la dependencia nutritiva de fuentes internas a externas de diferentes elementos presenta tasas distintas (Fenner, 1987).

En general, el tamaño de la semilla es correlacionado con la tolerancia de las plántulas a varios estréses abióticos como ser la sombra y la sequía. La flexibilidad de las plántulas ante varios factores abióticos podría explicar la especialización de las especies a lo largo del gradiente ambiental. Estréses abióticos como una helada repentina o sequía severa podrán matar a los pequeños individuos directamente. Sin embargo, muchos otros factores como el sombreado, exceso de luz, calor, estrés hídrico o inundación tal vez no maten a la plántula inmediatamente, pero pueden disminuir su tolerancia a agentes bióticos mortales como herbívoros y patógenos. Muchas veces factores bióticos causan estrés abiótico: la competencia intra-específica priva a las plántulas emergentes de luz y recursos de suelo causando su mortalidad. A su vez, las plántulas son más vulnerables al daño físico: pueden ser arrancadas de raíz, quebradas, o pisoteadas por animales que no necesariamente sean herbívoros.

Especies que producen semillas de mayor tamaño se establecen de inmediato sobre un amplio rango de condiciones ambientales, mientras que las especies de semillas pequeñas son más dependientes (Kitajima & Fenner, 2000). Este concepto podría ser aplicado a la variación seminal interespecífica. El tamaño de la semilla puede ser, en muchas ocasiones, crucial determinando el *fitness*. Semillas grandes dan lugar a plántulas grandes. El tamaño presume ser una ventaja para el establecimiento: semillas mayores podrán penetrar más profundo en el suelo explorando un gran volumen de suelo velozmente y competir por luz de manera más eficiente que plántulas de menor tamaño. Sin embargo, la desventaja de las plántulas más chicas se ve compensada con la distancia de dispersión. Semillas pequeñas podrán dispersarse a mayores distancias e incrementar de esta manera las chances de escapar a factores de mortalidad denso-dependientes (Kitajima & Fenner, 2000).

El primer factor abiótico causante de estrés es la profundidad en el suelo que la plántula debe atravesar para emerger. Las simientes de mayor tamaño se encuentran mejor equipadas para emerger de mayores profundidades. Las más pequeñas, en caso de germinar, agotan sus reservas antes de llegar a la superficie y las que logran emerger etioladas sufren una gran mortalidad. Hay que considerar que la transmisión de luz a través de las capas de suelo es casi nula (Kitajima & Fenner, 2000).

Las plántulas pueden emplear diferentes estrategias para evitar el sombreado temporal y espacial. Las especies pertenecientes a pastizales templados tienden a germinar en otoño,

posiblemente para reducir la sombra a causa de sus vecinos. La elongación del tallo, o más precisamente el hipocótile, ayuda a evitar el sombreado por la vegetación circundante, lo que resulta una estrategia particularmente efectiva cuando las plántulas presentan una tasa de crecimiento elevada. Sin embargo, un crecimiento veloz trae aparejado una menor densidad en los tejidos volviéndose las plántulas más propensas a sufrir daños por herbívoros y patógenos (Kitajima & Fenner, 2000).

La sequía puede ser fatal para las semillas germinando y las pequeñas plántulas. Los micro sitios que previenen de la desecación son sitios seguros para el establecimiento de las especies dominantes en praderas anuales. Los potenciales osmóticos de micro-sitios sin vegetación, y por lo tanto sin competencia por el recurso hídrico, en suelos de zonas áridas y semiáridas son más favorables para la supervivencia de la plántula que si contaran con vegetación, aunque la evapotranspiración es mayor. Por lo tanto, bajo estas circunstancias, cuanto más temprana sea la germinación más chances de sobrevivir a la estación seca (Kitajima & Fenner, 2000).

Una gran plasticidad fenotípica es esperada en las plántulas como consecuencia de que las causas de mortalidad cambian de estación a estación y de lugar en lugar. Dentro de una misma especie la presión de selección varia constantemente. Esto evita el desarrollo de una alta adaptación hacia factores específicos de mortandad como ser la sombra o la sequía. Una estrategia muy efectiva para ganar terreno aún con presiones de selección variantes es responder con una elevada plasticidad fenotípica. Hay características, como ser el largo del hipocótile, que muestran un considerable grado de flexibilidad (Kitajima & Fenner, 2000).

En ambientes impredecibles, las plántulas adaptadas a determinadas condiciones ambientales necesitaran aclimatarse continuamente a los cambios (Kitajima & Fenner, 2000). Varias características influenciadas por la planta madre, como dispersión o dormición, pueden incrementar las posibilidades de supervivencia de una plántula. Asimismo, la detección del momento y lugar adecuado ayuda a evitar la competencia por plantas ya implantadas (Fenner, 1987).

1.3 Efecto materno

Durante la ontogenia de las plantas, cada organismo posee una cantidad finita de recursos disponibles como energía y nutrientes. El modo en el cual se particionen esos recursos entre las actividades vitales (crecer, defenderse, reproducirse, entre otros) determinará la probabilidad de que determinados genes perduren en la siguiente generación. La distribución relativa entre las diferentes demandas será diferente entre organismos en hábitats distintos. Derivar más recursos hacia una actividad determinada, como ser a los mecanismos de defensa, rebrotar o la producción de semillas, solo puede efectuarse a expensas de privar a otro posible destino de ellas. Se presume que la designación resultante de recursos entre actividades es la óptima para no ser comprometido por la selección, en definitiva, para optimizar su *fitness* (Fenner, 1985).

En términos generales, la palabra "fitness" hace alusión a la capacidad de una especie, población o individuo de reproducirse y perdurar en el tiempo. Según Thoday (1953), el primer componente del fitness implica la adaptación al ambiente contemporáneo dado que, ante un cambio en el medio, los individuos deben adaptarse para poder sostenerlo bajo dichas condiciones. Por lo tanto, el fitness de un grupo de individuos debe incluir la capacidad de sobrevivir en futuros ambientes y no puede definirse sin considerar la descendencia (Thoday, 1953).

1.3.1 Definiciones

La variación fenotípica de un individuo puede estar determinada no solo por el genotipo y el ambiente que experimenta, sino también por el efecto materno. En otras palabras, la planta madre influencia el fenotipo de su progenie más allá de la contribución cromosómica ejercida por cada progenitor (Roach & Wulff, 1987).

Roach & Wulff (1987) distinguen tres clases de efectos maternos (Figura 1.11):

- 1. Extra-cromosomal o citoplasmático: los plástidos y las mitocondrias son organelas que pueden ser transferidas directamente por la planta madre durante la formación y desarrollo del óvulo. Esta transmisión es independiente de los genes nucleares. Hay especies en las que el tamaño seminal se encuentra determinado en parte por la herencia citoplasmática (Baskin & Baskin, 1998).
- 2. Endospermal: el endosperma es el saco que contiene al embrión durante su desarrollo y perdura hasta la germinación. Cumple múltiples funciónes desde aporte de enzimas hasta ser fuente nutricional. Su carga genética es 3N siendo ²/₃ aportados por la madre, contribuyendo con un mayor peso en todas las funciónes que cumple este tejido.
- **3.** Fenotipo materno: las condiciones ambientales que experimente la planta madre van a determinar su fenotipo el cual, a su vez, va a tener consecuencias en la

descendencia. Estas influencias tienen lugar vía estructural o fisiológica y se desarrollan en profundidad a continuación.

Los tejidos que rodean al embrión y forman la semilla son todos de origen materno, como lo son los que forman el fruto, en el caso de poseer, y diversas estructuras como pelos, aristas, etc, las que juegan un rol fundamental en la dispersión.

Son sustancias producidas por las plantas madre las que abastecen a la semilla durante su llenado, por lo que dicha progenie se verá influenciada por las sustancias químicas producidas por su progenitora. Esta podría ser una explicación, al menos parcial, a los diferentes grados de dormición que suelen observarse en las especies (Baskin & Baskin, 1998).

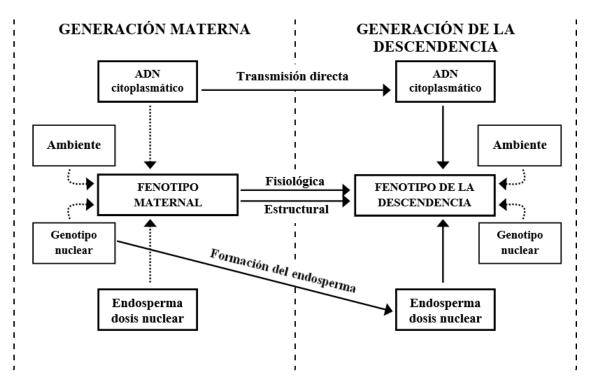


Figura 1.11 Diagrama de los efectos maternos y otras influencias sobre el fenotipo durante la generación de la progenie. Las flechas solidas representan los efectos maternos (adaptado de Roach & Wulff, 1987).

El momento donde el ambiente ejerce una mayor influencia sobre atributos seminales es durante los últimos 5-15 días de la maduración en la planta madre (Gutterman, 2000). El desarrollo de la semilla en la planta madre es una sucesión de eventos que se divide en dos fases de similar duración. Durante la primera toma lugar la morfogénesis: se forma el embrión (ejes radicular y caulinar y tejidos como el vascular y el dermal) y los tejidos de reserva (endosperma y/o perisperma). El cese de la división celular marca el comienzo de la segunda fase, la maduración. La maduración implica la acumulación de compuestos de almacenamiento, el desarrollo de la tolerancia a la desecación y la pérdida final de agua. Durante este proceso hay elongación celular por la acumulación de cuerpos proteicos y lipídicos y se impone la dormición.

Las semillas en desarrollo son una rica fuente de citoquininas, auxinas, GAs y ABA (Figura 1.12) (Finkelstein, 2005; Karssen, 1995). Considerando esto, es fácil visualizar que cualquier variante en el ambiente que modifique en algún aspecto el resultado final del proceso, es decir la semilla, le causará consecuencias tanto morfológicas como fisiológicas. Ejemplos de estas situaciones incluyen variaciones en el grosor, composición o permeabilidad de las cubiertas seminales influyendo sobre su germinabilidad.

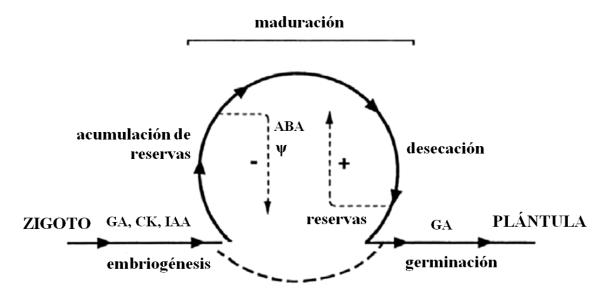


Figura 1.12 Representación generalizada del desarrollo del embrión en las angiospermas mostrando los tres estados principales de zigoto a plántula: embriogénesis, maduración y germinación. Momentos donde los efectos ambientales más influencias y más se manifiestan (adaptado de Finkelstein, 2005).

Es en las primeras etapas del ciclo de vida donde más se manifiestan los efectos maternos. Las condiciones locales bajo las cuales una semilla madura consiste en una combinación del microambiente experimentado por el individuo debido a su posición en la planta madre y el ambiente abiótico que circunde a dicha planta (temperatura, fotoperíodo, intensidad lumínica, disponibilidad hídrica, nutricional etc.) (Gutterman, 2000). Los efectos maternos pueden perdurar por más de una generación (Wulff, 1995).

La epigenética hace referencia a cambios heredables en el fenotipo, y por lo tanto en la regulación génica, que no son causados por alteraciones en la secuencia de ADN, es decir, con total ausencia de variabilidad genética (Masueli & Marfil, 2010).

La presente tesis se basa en los efectos maternos debido al ambiente. Ejemplos puntuales de factores ambientales influyendo en ciertas características de la descendencia se citarán en el capítulo pertinente.

1.3.2 Efecto materno: estrategia adaptativa

Los efectos maternos pueden influir en varias características relacionadas al *fitness*, cobrando por ello importancia ecológica y evolutiva (Wulff, 1995).

En los ambientes impredecibles, son tres las características particularmente importantes para la mantención de la especie en el tiempo: la producción de un banco de semillas, la dispersión y el tamaño seminal. Esto se debe a que interactúan, aumentando la diversidad fenotípica, para reducir el impacto ante una variación ambiental (Wulff, 1995).

La capacidad de una semilla para dispersarse es considerada un atributo materno, dado que todas las estructuras adaptadas a tal fin son originadas de tejidos maternales. La ventaja de establecerse lejos de la planta madre radica en evitar las condiciones perjudiciales para la especie, mientras que establecerse en el mismo sitio es ventajoso cuando cuando ya fue testeado y considerado como "favorable" por su progenitor (Wulff, 1995).

Buglossoides arvensis es una especie monocárpica, es decir que su reproducción se produce una sola vez, hecho que inmediatamente es seguido por la muerte de la planta. Las especies anuales, comúnmente, producen semillas lo más rápido posible. Su calendario de fertilidad es determinado genéticamente, pero responde adaptándose a las diferentes presiones ambientales. Si hay un alto riesgo de mortalidad, un retraso en la producción de semillas puede resultar en un fracaso reproductivo por muerte anticipada. Por lo tanto, en ambientes inestables se ven favorecidas las especies que producen al menos algunas semillas lo antes posible. Sin embargo, la desventaja de una reproducción precoz es el menor tiempo disponible para la adquisición de los recursos necesarios para destinar a las semillas. De aquí surge una disyuntiva, si producir más rápidamente menos semillas o retrasar la producción por un mayor número (Fenner, 1985). Como se mencionó en secciones anteriores, B. arvensis es facultativa germinando tanto en otoño como en primavera. En las observaciones efectuadas en la región del presente estudio, las plantas de la especie describen claramente estos comportamientos. Las que germinan en primavera presentan una tasa de desarrollo elevada, completando su ciclo en pocas semanas dada la cercanía a la estación desfavorable. Su crecimiento es escaso como la producción de semillas. Por el contrario, las de emergencia otoñal priorizan un vigoroso crecimiento en el estado vegetativo formando una gran roseta. Un mayor tamaño vegetativo permite competir efectivamente con la vegetación circundante y trae aparejado una mayor producción de semillas.

1.3.3 Agentes causales

1.3.3.1 Efecto de la planta madre

La posición de la semilla en diferentes partes, órganos o frutos, incluso su ubicación en la inflorescencia o dentro de un fruto en una misma planta, puede afectar su color, tamaño, morfología e incluso germinación. En especies perennes, la edad de la planta puede influenciar la germinabilidad de su progenie (Gutterman, 2000).

Semillas desarrolladas en diferentes posiciones en la planta madre pueden presentar diferencias en el grado de dormición o en los requerimientos germinativos. Una explicación para estas variantes es que los recursos no son volcados de la misma manera en todas las semillas. De este modo, habrá semillas de mayor tamaño que otras variando en los caracteres antes mencionados. Además, especialmente en las especies indeterminadas, las condiciones ambientales experimentadas por las semillas en formación en la base de la inflorescencia no son las mismas que las vivenciadas por las apicales (Baskin & Baskin, 1998). Estos microambientes, producen consecuencias sobre el comportamiento germinativo, ensanchando el rango de condiciones donde podrá regenerarse la población (Fenner, 1985).

1.3.3.2. Efecto ambiental

Son muchos los factores ambientales que interactúan simultáneamente durante el ciclo de vida de una planta y es difícil poder atribuir la influencia de cada uno individualmente. Sin embargo, en lo que concierne al efecto materno sobre las características iniciales del desarrollo de su progenie, hay ciertos patrones que parecen repetirse. De esta manera, Gutterman (2000) menciona como regla que la adición de fertilizantes, especialmente nitrógeno, decrece la dormición en las semillas. A su vez, Baskin & Baskin (1998) detallan que los tratamientos con fertilizantes afectan a la dormición fisiológica, siendo la respuesta más común cambios en los porcentajes de germinación.

Fenner (1985), asocia a las semillas de mayor tamaño con los ambientes secos, aún dentro de la misma especie. Se cree, que el mayor tamaño seminal de las plantas expuestas a sequía se debe a que la selección actúa a favor de las plántulas que pueden establecer velozmente un sistema radicular más extenso, desde sus propias reservas. A su vez, la sequía durante la maduración seminal afecta la germinabilidad. Una posible explicación es el cambio que causa en la composición de los tejidos que rodean la semilla, cambios en los patrones proteicos y de ARNm. En general ante un mayor estrés hídrico la dormición tiende a decrecer, pero hay evidencias que no siempre es así, no pudiéndose establecer como ley (Gutterman, 2000; Baskin & Baskin, 1998). Baskin & Baskin (1998) citan varios ejemplos de especies de dormición fisiológica cuyo nivel de dormición ha decrecido ante la exposición a sequía.

La temperatura experimentada durante la formación seminal también influye en el nivel de dormición. El resultado que más se obtuvo ante un aumento en la temperatura ambiental fue el incremento en los porcentajes y/o tasas de germinación. Sin embargo, este comportamiento se encontró ligado al momento durante el ciclo reproductivo de la planta donde la temperatura fue elevada, afectando los requerimientos para germinar de la progenie (Baskin & Baskin, 1998).

Tanto la calidad como la intensidad lumínica evidenciaron influir en atributos de la descendencia. Cuando se evaluó el efecto de la intensidad lumínica sobre la dormición, diferentes especies reaccionaron de distinta manera, ya sea incrementando o disminuyendo el porcentaje de

germinación, por lo que no puede describirse un patrón al respecto (Baskin & Baskin, 1998). En cuanto a la calidad lumínica (relación rojo: rojo-lejano) experimentada durante el desarrollo seminal, se estima que influye en la sensibilidad a la luz que luego manifiesta la descendencia. Este hecho estaría relacionado con el tejido materno que cubre a las semillas durante su formación, estando el requerimiento lumínico para germinar fuertemente correlacionado con la clorofila retenida en las estructuras que visten la semilla. Semillas que han madurado rodeadas de tejidos verdes exibirán la mayor parte de su fitocromo en forma inactiva (Pr) requiriendo un estímulo lumínico para germinar. Contrastando con semillas donde la luz recibida, independientemente de su calidad, no es filtrada donde el fitocromo es hallado en su forma activa (Pfr) pudiendo germinar tanto en luz como en oscuridad (Cresswell & Grime, 1981).

1.3.4. Atributos de fuerte influencia materna y su importancia ecológica

Dormición y emergencia: La maduración de diferentes semillas con diferente germinabilidad sobre una misma planta madre posee importantes ventajas ecológicas, especialmente si se trata de malezas sobreviviendo bajo condiciones impredecibles. En estos ambientes, el momento, intensidad y cantidad de lluvia, así como las variaciones térmicas son inciertas. De esta manera, la especie se asegura que luego de una precipitación, solo una porción del total del banco de semillas germine, no extinguiéndose en el sitio en caso de que el ambiente se vuelva desfavorable para su subsistencia (ej. sequía y/o temperaturas elevadas) (Gutterman, 2000).

Especies de diferentes familias, ciclos de vida y comunidades han exhibido diferencias en características germinativas de su progenie, ya sea grado de dormición, tasa germinativa o en las condiciones requeridas para germinar debido al lugar donde se desarrollaron. Dependiendo de la especie las variaciones se dan con la latitud, altitud, condición hídrica y/o nutritiva del suelo, temperatura, fotoperíodo, tipo y densidad de plantas vecinas y diferentes grados de disturbios en los sitios donde las semillas maduran (Baskin & Baskin, 1998).

Tamaño seminal: El tamaño de la semilla puede afectar características juveniles y adultas y es, probablemente, uno de los indicadores más tempranos de la calidad de la progenie. Semillas de mayor tamaño podrán emerger de mayores profundidades dado que cuentan con mayores reservas. Por esta razón las plántulas resultantes serán más grandes y tolerarán mejor una privación nutritiva. A su vez, en muchas especies se notó una emergencia más temprana con el consecuente provecho temporal de poder captar recursos antes tomando ventaja ante la competencia y presentando mayores probabilidades de supervivencia. La producción de semillas de mayor tamaño suele asociarse con menor cantidad. Por otro lado, las ventajas de las semillas de menor tamaño se relacionan con la dispersión, la tasa de germinación, el escape a herbívoros y la perduración en el banco de semillas (Wulff, 1995).

El tamaño de la semilla es un atributo muy plástico que varía dependiendo de las condiciones ambientales, especialmente de la disponibilidad de recursos. A nivel de planta individual también se observan variaciones en el tamaño seminal determinadas por una competencia en los recursos (Wulff, 1995). La estrategia de cada individuo de cómo administrar sus recursos se encuentra programada genéticamente y determina la fracción destinada para reproducción en un ambiente dado. Es decir que el esfuerzo reproductivo (biomasa reproductiva/biomasa total) va a estar condicionado por los factores ambientales. En las especies con elevada plasticidad fenotípica la influencia ambiental será mayor mientras que en aquellas especies donde la fracción destinada a reproducción se encuentra rígidamente fijada se independiza del ambiente (Fenner, 1985).

Un elemento importante en la estrategia reproductiva concierne a la partición de recursos destinados a reproducción en relación al número y tamaño de las semillas, existiendo un claro antagonismo entre ellos (Fenner, 1985). La planta madre se encuentra en un "trade-off": debe repartir sus recursos en simientes de mayor tamaño o incrementar el número de semillas producidas. Siempre hay una presión de selección a generar una mayor cantidad de semillas dado que representa una progenie más numerosa. Sin embargo, debe haber un límite inferior de tamaño seminal que le permite a la futura plántula ser funcional. La optimización de recursos por parte de la planta progenitora será aquella que produzca la mayor cantidad de semillas del mayor tamaño posible, dadas las ventajas competitivas y de supervivencia que presenta una plántula proveniente de una semilla mejor provista (Figura 1.13). Por lo tanto, si la planta madre cuenta con más recursos para aprovisionar a su descendencia, producirá más semillas de un mayor tamaño (Leishman et al., 2000). El ambiente experimentado por la planta madre influye en la descendencia ya que se ajustan atributos morfológicos (tamaño) y/o fisiológicos (en relación directa con el tamaño, ej. dormición en algunas especies) y la cantidad de semillas a producir dependerá de los recursos disponibles por lo que se deduce que para una misma especie el tamaño y cantidad de semillas resultantes estaría condicionado por las condiciones imperantes en el momento de su producción.

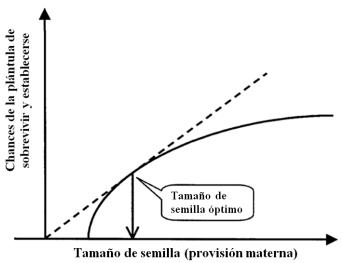


Figura 1.13 Distribución óptima de recursos maternos entre sus semillas en un ambiente determinado. (----): Chances de una plántula de sobrevivir y establecerse en función de la masa seminal que le dio origen (—): perspectiva de sobrevivencia de todas las plántulas producidas en una camada de semillas. Desde el punto de vista genético, hay un punto de inflexión donde a partir del cual un tamaño de semilla a expensas de un menor número de individuos, deja de ser conveniente. La mejor asignación de recursos a cada semilla es cuando se produce la mayor cantidad de semillas del tamaño menor que garantiza su supervivencia en la siguiente generación y por ende maximiza el *fitness* materno.

Tamaño de la plántula: el tamaño de la plántula se correlaciona positivamente con el de la semilla. Hay que considerar que la ventaja al respecto de semillas de mayor tamaño se mantendrá si las tasas de crecimiento son constantes. Sin embargo, son las plántulas provenientes de semillas de menor tamaño las que presentan tasas más veloces. Una plántula más grande será más competitiva en la toma de recursos, pero una de menor tamaño tolerará mejor períodos cortos de sequía dada su menor transpiración. A su vez, los tamaños iniciales son importantes predictores del tamaño final de la planta y su capacidad productiva (Wulff, 1995).

1.4 Región semiárida del Sudoeste bonaerense

El sudoeste bonaerense es una región que comprende 11 partidos (Figura 1.14a). Posee un clima continental templado caracterizado por una gran variabilidad climática, principalmente en las precipitaciones, temperaturas, vientos y humedad relativa ambiente (Glave, 2006). Los veranos e inviernos se encuentran bien marcados. En verano son habituales temperaturas superiores a los 30 °C, mientras que en invierno son normales las temperaturas cercanas al índice de congelamiento. Las primaveras y otoños son moderados. La temperatura media anual es de 15 °C no siendo gradual la variación térmica en el área, sino que responde a factores locales como altitud y continentalidad (Figura 1.14c).

Las isohietas de 500 y 700 mm atraviesan el área en dirección sudoeste-noreste (Figura 1.14b) determinando, junto con los tipos de suelos, las aptitudes agrícolas de las diferentes zonas. Las precipitaciones son variables concentrándose en los períodos de otoño y primavera, a fines de invierno se da una estación seca y otra semiseca a mediados de verano. Las lluvias pueden llegar a valores extremos de bajas precipitaciones característica común a ambientes áridos o semiáridos y a valores muy por encima al promedio anual similares a regiones extremadamente húmedas. La suma de estas desviaciones positivas o negativas por encima o por debajo del promedio anual, da lugar al movimiento cíclico o marcha secular, que en definitiva significa la ocurrencia de varios años húmedos, secos o medianamente secos. Lo que comúnmente se dice se ha presentado un "Niño" (período húmedo) o una "Niña" (período seco) (Glave, 2006).

El período libre de heladas comprende los meses de diciembre, enero y febrero, aunque en toda la región existe probabilidad de heladas en cualquier momento del año (Krüger, 2015; Gómez *et al.*, 1981).

Los suelos predominantes son de textura mediana a gruesa, de buena permeabilidad, cuya profundidad oscila entre 80 y 100 cm limitados por un horizonte petrocálcico (tosca) (Galantini *et al.*, 1992; Gómez *et al.*, 1981). En la región semiárida (sudoeste) dominan los suelos Haplustoles/Hapludoles y en la sub-húmeda (noreste) Argiustoles/Argiudoles, con inclusiones de aéreas arenosas y depresiones salitrosas: Entisoles y Aridisoles (Krüger, 2015). Dadas las características climáticas y edáficas propias de la región semiárida, el uso o manejo de los sistemas agrícolas ha provocado, y provoca, cambios marcados en los suelos (Galantini *et al.*, 1992) y por ende en la vegetación espontánea.

En los últimos años ha sido posible observar profundas perturbaciones climáticas, atribuibles en parte al avance del calentamiento del planeta y al ritmo estadístico de la ocurrencia de estos fenómenos.

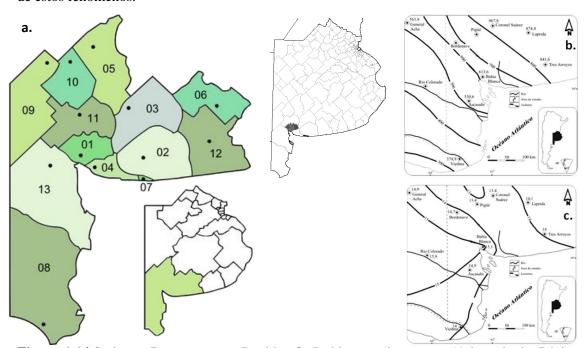


Figura 1.14 Sudoeste Bonaerense. **a.** Partidos. **b.** Isohietas. **c.** isotermas. (Adaptado de: Páginas de internet 5, 6, 7).

1.4.1 Partido de Bahía Blanca

El partido de Bahía Blanca posee una superficie de 2.247,49 km² de la cual 204.012 ha son agropecuarias. Comprende a las ciudades de Bahía Blanca, Cabildo, General Cerri, Ingeniero White y Grunbein. Se encuentra atravesado por la isohieta de 500 mm (Figura 1.14b) siendo sus precipitaciones muy variantes tanto inter como intra-anualmente. Los suelos en su mayoría presentan textura franco-arenosa/arenosa fina con acentuadas deficiencias de fertilidad

nitrogenada. Estas características definen a la zona principalmente como ganadera. Entre los cultivos producidos el destacado es el trigo.

1.4.2 Estación experimental del CERZOS (UNS-CONICET)

Todas las evaluaciones realizadas a campo se llevaron a cabo en el predio experimental del CERZOS localizado en el CCT CONICET-Bahía Blanca (38°39′54"S, 62°13′58"W). El suelo es de textura arenosa (haplustol típico), contiene un 2% de materia orgánica, 4,6 mg kg⁻¹ de N-NO₃ y una reacción alcalina (pH= 7,5).

1.5 Hipótesis y objetivos

Como se mencionó en la sección anterior, la zona de Bahía Blanca presenta un ambiente con un alto grado de incertidumbre climática, por lo que su vegetación establecida posee necesariamente atributos de adaptabilidad fenotípica para sobrevivir. Una de las estrategias adaptativas es debida a la influencia de las plantas madres sobre la progenie, la que será estudiada en la especie *B. arvensis*.

En base a la información acumulada luego de varios años de estudiar esta especie en otras temáticas y a la numerosa bibliografía consultada, se generaron las siguientes hipótesis:

H₁: Diferentes ambientes maternos causan variaciones en el nivel de dormición de las semillas de *B. arvensis*, pudiéndose medir dichos cambios mediante el uso de modelos matemáticos termales.

H₂: Cambios en el nivel de dormición ante diferentes disponibilidades nitrogenadas durante el desarrollo seminal, se vinculan con variaciones en la sensibilidad y/o producción de las fitohormonas GA₃ y ABA.

H₃: Bajo diferentes condiciones ambientales (estatus hídrico, nivel nitrogenado e intensidad lumínica) se desarrollarán plantas madres con diferencias morfológicas traduciéndose en cambios sobre la producción y los atributos morfo-fisiológicos de la progenie.

Los objetivos generales consisten en:

- comprender las diferencias en el nivel de dormición de semillas de *B. arvense* provenientes de madres con ambientes contrastantes y dilucidar el control hormonal.
- Determinar cambios en las características morfo fisiológicas de las semillas y plántulas vinculadas a diferentes ambientes, a los fines de comprender mejor la estrategia de adaptación al medio.

Los objetivos específicos consisten en:

- Determinar diferencias en los niveles de dormición primaria de poblaciones de semillas provenientes de madres sometidas a dos condiciones hídricas contrastantes y fertilizadas diferencialmente cuantificándolos mediante parámetros térmicos.
- Determinar cambios en la sensibilidad y/o en la producción de ácido giberélico y abscísico bajo temperaturas sub, supra y óptimas y relacionarlo con la fertilización nitrogenada a la que fueron sometidas las plantas madres.
- Determinar diferencias en la emergencia de plántulas descendientes de plantas crecidas bajo un gradiente de intensidad lumínico, hídrico y nitrogenado para de esta manera poder predecir lo esperado en un lote en función de las características ambientales dadas el año anterior.
- Cuantificar las variaciones en tamaño y número de las semillas producidas bajo condiciones diferenciales de luz, estado hídrico y disponibilidad nitrogenada.
- Cuantificar variaciones morfológicas en las plántulas procedentes de diferentes ambientes y relacionarlos con su habilidad competitiva.

CAPÍTULO II

Efecto trans-generacional de la fertilización nitrogenada y la disponibilidad hídrica en el suelo sobre la germinabilidad de *Buglossoides arvensis*

2.1 Introducción

En las malezas el momento de emergencia es clave para asegurar su implantación, desarrollo y éxito reproductivo con la consiguiente continuidad en el sistema. La dormición es un atributo intrínseco de las semillas altamente influenciable por las condiciones ambientales imperantes en su momento de desarrollo. El ambiente maternal definirá el ajuste (*fitness*) de la progenie (Donohue & Schmitt, 1998; Gutterman, 2000; Galloway, 2005).

La evidencia proveniente de observaciones a campo y experimentos bajo condiciones controladas muestra ciertos patrones bien definidos de emergencia. Los mismos son consecuencia del efecto materno, es decir del ambiente experimentado por las plantas madres, tendiendo a ser similares entre un amplio rango de especies. Una menor dormición (i.e., mayor germinabilidad) se asocia generalmente con altas temperaturas, días cortos, sequía y altos niveles nitrogenados durante el desarrollo seminal (Fenner, 1991).

Numerosos casos de estudio han evaluado el efecto de la disponibilidad hídrica al momento de la formación seminal sobre la germinabilidad o el nivel de dormición resultante. Gutterman (2000) afirma que la desecación aumenta la germinabilidad y ensayos realizados en numerosas especies lo confirman. Como ejemplo se puede citar a *Avena fatua* (Peters, 1982a; Perters, 1982b), *Datura ferox* (Sánchez *et al.*, 1981), *Sinapsis arvensis* (Luzuriaga *et al.*, 2006; Wright *et al.*, 1999), *Sorghum bicolor* (Benech-Arnold *et al.*, 1991) y *Amaranthus retroflexus* (Karimmojeni *et al.*, 2014), entre otros. En semillas de *Lolium rigidum* producidas bajo estrés hídrico no se observaron diferencias en el nivel de dormición primaria al momento de su dispersión natural. Sin embargo, las mismas despertaron más velozmente que semillas generadas sin limitantes hídricas (Steadman *et al.*, 2004). Por otro lado, en otras especies, condiciones de estrés hídrico durante la ontogenia han generado un aumento en el nivel de dormición primaria (Galloway, 1995).

Una elevada disponibilidad nitrogenada por parte de la planta madre genera descendencia más despierta (Gutterman, 2000). Numerosos trabajos en diferentes especies afirman esta cita, entre los que se encuentran los publicados para *Beta vulgaris* (Inoe & Yamamoto, 1977), *Chenopodium album* (Fawcett & Slife, 1978), *Nicotiana tabacum* (Thomas & Raper, 1979), *Senecio vulgaris* (Aarssen & Burton, 1990), *Arabidopsis thaliana* (Alboresi *et al.*, 2005) y *A. retroflexus* (Karimmojeni *et al.*, 2014). Sin embargo, hay excepciones a esta regla. La fertilización con NO₃⁻ no afectó la dormición en *Abutilon theophrasti* (Fawcett & Slife, 1978) y la aplicación de UREA granulada en *S. arvensis* disminuyó la tasa de germinación en la progenie (Luzuriaga *et al.*, 2006).

La dormición fisiológica es usualmente la más abundante en semillas a campo. En especies de malezas otoño invernales, las semillas con dormición primaria requieren de un período de post-maduración, que generalmente abarca varios meses, de almacenamiento en seco a temperatura ambiente. La post-maduración en las semillas se caracteriza por: (i) ampliar la ventana

germinativa, es decir, adquirir la capacidad de germinar bajo un rango más amplio de condiciones ambientales; (ii) modificar el balance hormonal ABA/GA y la sensibilidad a dichas hormonas, (iii) aumentar la sensibilidad hacia los factores que promueven la germinación (luz, nitratos, etc.) e (iv) incrementar la velocidad germinativa (Finch-Savage & Leubner-Metzger, 2006).

La temperatura posee una influencia primaria sobre la dormición y germinación. Afecta tanto la capacidad para germinar regulando la dormición como la tasa de germinación en las semillas despiertas (Alvarado & Bradford, 2002). El tiempo térmico (i.e. expresado como la suma de grados días (°Cd)) provee una medida del tiempo biológico requerido para completar un proceso dado (Trudgill *et al.*, 2005), de esta manera, la magnitud de dicho proceso (e.g. salida de la dormición) puede ser descripta por medio del cálculo de parámetros poblacionales específicos (Alvarado & Bradford, 2002).

La germinabilidad en semillas de varias especies fue evaluada mediante varios enfoques de modelización basados en parámetros poblacionales. Entre los ejemplos se encuentran especies cultivadas como *Solanum tuberosum* (Alvarado & Bradford, 2002) y *Helianthus annuus* (Bazin *et al.*, 2011), *Brunonia australis* y *Calandrinia sp* (Cave *et al.*, 2011), *Papaver somniferum* (Kamkar *et al.*, 2012) y *Pisum sativum*. Para esta última especie se analizaron las temperaturas cardinales de varios cultivares no solo para la germinación, sino también para otros procesos fenológicos (Olivier & Annandale, 1998).

Diversos trabajos han permitido la obtención de la temperatura base de distintas especies de malezas, tales como Amaranthus albus, A. palmeri, Digitaria sanguinalis, Echinocloa crusgalli, Portulaca oleracea y Setaria glauca (estivales), Hirschfeldia incana y Sonchus oleraceus (invernales) y la facultativa Conyza canadensis (Steinmaus et al., 2000). Para otras especies anuales estivales se describió la germinabilidad, citando como ejemplo a Amaranthus patulus (Washitani & Takenaka, 1984), Polygonum aviculare (Batlla & Benech-Arnold, 2003) y Aesculus hippocastanum (Steadman & Pritchard, 2003). En ambas especies se evaluó la salida de la dormición en función de la temperatura de estratificación. Entre los ejemplos estudiados de malezas anuales invernales se encuentra Silybum marianum (Parmoon et al., 2015), donde se ajustó un modelo bilineal para la determinación de las temperaturas cardinales, y Buglossoides arvensis (= Lithospermum arvense) (Chantre et al., 2009b).

Entre los casos evaluados en especies perennes se han estudiado los requerimientos térmicos para la salida de la dormición de *Rhamnus persicifolia* (Porceddu *et al.*, 2013). En *Eurotia lanata* se utilizaron los modelos de tiempo térmico con el fin de explicar la anticipada germinación de las semillas de mayor tamaño respecto de las más pequeñas en la estación de crecimiento. Los resultados arrojaron como respuesta una menor temperatura base para las semillas más grandes permitiéndoles acumular mayor tiempo térmico a una temperatura dada y, de este modo, germinar antes (Wang *et al.*, 2004). Orrú *et al.* (2012) analizaron el comportamiento de poblaciones de *Vitis vinifera* subsp. *Sylvestris* desarrolladas en diferentes altitudes. La

sensibilidad a acumular unidades de tiempo termal (°Cd) aumenta con la altitud reduciendo su requerimiento de tiempo térmico en poblaciones que se desarrollaban en zonas elevadas. Esto permitiría una germinación más veloz en un ambiente donde la estación de crecimiento se ve potencialmente reducida. En *Carex diandra* se determinaron, mediante la implementación de un modelo de temperaturas cardinales, los cambios germinativos ante dos posibles escenarios climáticos (Fernández-Pascual *et al.*, 2015).

Para el caso específico de *B. arvensis*, Chantre *et al.* (2009b) propusieron un modelo de post-maduración en el cual el nivel de dormición primaria de la población se describió en función de la acumulación del tiempo térmico de post-maduración. Como dichos autores indican, la tasa de la salida de la dormición en *B. arvensis* se encuentra positivamente correlacionada con la temperatura de almacenamiento. Al aumentar la temperatura de post-maduración se anticipa el ensanchamiento del rango termal permisivo para la germinación.

Según un estudio realizado por Bischoff & Mahn (2000) basado en la regeneración de comunidades de malezas luego de cesar la fertilización en campos arables de la región central alemana de Chernozem, la aparición de *B. arvensis* se asociaba a suelos con baja disponibilidad nitrogenada. A pesar de este hecho, la producción de biomasa y de semillas de *B. arvensis* tiende a incrementarse en parcelas enriquecidas con nitrógeno en experimentos de larga duración a campo (Bischoff & Mahn, 2000).

En la región semiárida templada argentina, específicamente en el sudoeste bonaerense, la intensificación de los sistemas agrícolas ha dado lugar a un incremento significativo a la aplicación de insumos, como los fertilizantes nitrogenados. El potencial impacto de la aplicación de nitrógeno sobre la dinámica demográfica de *B. arvensis* es un factor de interés para definir acciones adecuadas de control. Por lo tanto, se hace necesario generar información que pueda ayudar a desarrollar mejores estrategias de manejo de malezas.

Con el objetivo de entender la respuesta de las comunidades vegetales a las aplicaciones diferenciales de nitrógeno, es necesario profundizar nuestro conocimiento sobre la habilidad de las diferentes poblaciones al utilizar distintos niveles de fertilización nitrogenada (Mahn, 1988). Tales investigaciones ayudarían a dilucidar las interrelaciones entre los efectos directos e indirectos de los cambios en las fertilizaciones de nitrógeno a largo plazo en el campo.

El estudio de la germinabilidad de las malezas presentes en la zona es de vital interés para poder predecir el comportamiento en el siguiente año y así planificar un óptimo control. Basados en las hipótesis de que tanto la disponibilidad hídrica como la fertilización nitrogenada de las plantas madres de *B. arvensis* influencian el nivel de germinabilidad de la progenie, el objetivo del presente capítulo se basó en determinar el efecto de dos situaciones hídricas contrastantes y tres niveles diferenciales de fertilidad nitrogenada sobre la germinabilidad de la progenie. Se utilizó el modelo propuesto por Chantre *et al.* (2009b) para estimar los parámetros térmicos

poblacionales en función de las condiciones hídricas y nitrogenadas experimentadas por las plantas madre.

2.2 Materiales y métodos

Se realizaron dos experimentos en paralelo:

- Experimento I: evaluación del efecto de la disponibilidad hídrica en el ambiente materno. El ensayo se realizó solo un año y luego se analizó el curso de la germinación de la descendencia determinando los parámetros de tiempo térmico al cabo de cuatro fechas de post-maduración (78, 136, 271 y 359 días).
- Experimento II: evaluación del efecto de la disponibilidad nitrogenada en el ambiente materno. Se evaluaron los efectos maternos sobre dos generaciones sucesivas de semillas (F₁ y F₂), considerando la presión de selección del factor ambiental manipulado. Los parámetros del modelo térmico se calcularon sobre semillas parcialmente dormidas y totalmente despiertas (90 y 380 días de post-maduración en cada caso).

2.2.1 Material vegetal

Las semillas utilizadas para la producción de las plantas madres fueron recolectadas de lotes de avena (*Avena sativa* L.) presentes en la Estación Experimental del INTA-Bordenave $(37^{\circ}50'55"S, 63^{\circ}01'20"W)$, Buenos Aires, Argentina. La cosecha se realizó manualmente en diciembre de 2010 y 2012. Las semillas obtenidas fueron, en ambos casos, almacenadas en seco en bolsas de papel a temperatura ambiente $(20 \pm 5 \, ^{\circ}C)$ durante 180 días, hasta que se iniciaron los ensayos a campo.

2.2.2 Generación de plantas madres

Los ensayos a campo se establecieron en el predio experimental del CERZOS. En todos los casos se colocó rastrojo luego de la siembra para evitar la evaporación del suelo.

- Experimento I:

Las semillas fueron sembradas en unidades experimentales (UE) de 1 m² delimitadas por una estructura de metal cubierta con polietileno a fin de evitar el ingreso de agua de lluvia (ver capítulo IV). La densidad final 45 DPS (Días Post Siembra) = 90 plantas m⁻².

Se instaló un sistema de riego por goteo a fin de lograr distintos niveles hídricos. Se siguió un modelo completamente aleatorizado con dos niveles de irrigación (H(0): baja frecuencia y H(+): alta frecuencia) y cuatro repeticiones (N=8).

El riego diferencial se proporcionó desde el estado de roseta (cuatro pares de hojas verdaderas) (Figura 2.1). Los tratamientos de baja (H(0)) y alta (H(+)) frecuencia de irrigación consistieron en abastecer con una película de 15 mm de agua dos veces a la semana o diariamente,

respectivamente. El tratamiento H(0) representó una condición de estrés para las plantas madres, mientras que en el régimen H(+) no hubieron restricciones hídricas.

A la madurez, previo a sudispersión natural, las semillas fueron cosechadas de las plantas madres y almacenadas en seco bajo condiciones de laboratorio (22 ± 2 °C) hasta el inicio de los test de germinación.



Figura 2.1 Diferencias en el crecimiento de *B. arvensis* debido a diferentes regímenes hídricos. **a.** síntomas de marchitez, especialmente en la parte apical. **b.** Plantas entrando en floración con baja disponibilidad hídrica. **c.** Plantas en floración con alta disponibilidad hídrica.

- Experimento II:

Los experimentos a campo fueron realizados durante 2011 y 2012 con el objetivo de cuantificar el efecto de la fertilización nitrogenada sobre la germinabilidad de la progenie (F_1 y F_2 , respectivamente).

En ambos años, los tratamientos maternales consistieron en tres niveles de disponibilidad nitrogenada generados mediante la fertilización con UREA granulada (46% N) (0 kg N ha⁻¹: N; 75 kg N ha⁻¹: N(+) y 150 kg N ha⁻¹: N(++)). La misma se proporcionó manualmente de manera particionada cuando las plantas madres se encontraban en estado vegetativo (4-8 pares de hojas) y en floración.

Cada unidad experimental abarcaba un área de 1 m² donde se sembraron las semillas de *B. arvensis* a dos cm de profundidad (Figura 2.2). Un stand promedio de 90 plantas m⁻² se logró al cabo de 45 DPS.

Un sistema de riego por goteo proporcionó agua adicional solo en caso de que fuese necesario para evitar condiciones de extrema sequía. Las UE fueron desmalezadas a mano semanalmente. Se siguió un diseño completamente aleatorizado con ocho réplicas (N = 24).

Al momento de la primera cosecha (enero, 2012), las semillas de la F_1 se recolectaron en tres grupos principales correspondientes a cada uno de los niveles de fertilización nitrogenada proporcionada a las madres (Figura 2.2). A su vez, cada grupo fue sub-dividido en dos sub-grupos con el objetivo de: (i) realizar test germinativos luego de 90 y 380 días de almacenaje en seco en cámara de crecimiento a 22 °C (\pm 1 °C) (ver sección de test germinativos); (ii) generar plantas madres para obtener la siguiente generación de semillas (F_2).

Las semillas de F_2 fueron cosechadas en enero del 2013 y sometidos a los mismos tiempos de post-maduración descriptas para F_1 .



Figura 2.2 Ensayo a campo de disponibilidad nitrogenada en las plantas madres de *Buglossoides arvensis*. **a.** Preparación de las unidades experimentales con aplicación del rastrojo para evitar la pérdida de humedad por evaporación; **b.** Plantas en floración recibiendo la segunda dosis de UREA granulada.

2.2.3 Test germinativos

Los test de germinación se llevaron a cabo sobre una plancha de aluminio de gradiente térmico (Chatterton & Kadish, 1969) a seis temperaturas constantes (5, 8, 12, 16, 20, 23 °C) por 21 días. Se utilizó un diseño completamente aleatorizado con cuatro repeticiones por efecto materno (N(0), N(+) y N(++)/ H(0) y H(+)) y 30 semillas por repetición. La viabilidad de las semillas no germinadas se evaluó mediante *crush test* (Borza *et al.*, 2007).

En el experimento I, los test se realizaron en cuatro momentos al cabo de 78, 136, 271 y 359 días de post-maduración. (Figura 2.3). En ambos años del experimento II, las evaluaciones germinativas se realizaron a los 90 (semillas parcialmente dormidas: PD) y 380 días (semillas nodormidas: ND) de almacenamiento en seco bajo condiciones controladas de laboratorio (22 ± 2 °C).



Figura 2.3 Ensayos germinativos en la plancha de gradiente térmico de dos generaciones sucesivas de *Buglossoides arvensis*. **a.** Ensayo realizado con las semillas cosechadas en enero del 2012, siguiendo un diseño completamente aleatorizado. **b.** Detalle de los separadores de acrílico que no permitía que se mezclen las repeticiones de 30 semillas. **c.** Ensayo realizado con las semillas cosechadas en enero del 2013, siguiendo un diseño completamente aleatorizado. **d.** Detalle de las divisiones utilizadas para separar los grupos de semillas.

2.2.4 Estimación de los parámetros térmicos poblacionales

Se utilizó el modelo de tiempo-térmico propuesto por Chantre *et al.* (2009b) para evaluar el comportamiento germinativo de la descendencia de madres sometidas a diferentes ambientes (ANEXO I). Para cada repetición se ajustó el modelo asumiendo una distribución normal tanto para la temperatura base (T_b) como para la temperatura máxima (T_m) dentro de cada población de semillas. Los parámetros de tiempo térmico sub- (θ_1) y supra-óptimo (θ_2) fueron considerados constantes entre las fracciones seminales (g).

$$\theta_{a1} = \left(T - T_{ba}\right) t_a \tag{1}$$

$$\theta_{g2} = (T_{mg} - T) t_g$$
 [2]

Donde T es la temperatura de incubación y t_g es el tiempo de germinación de una fracción dada de semillas g. Se asumió una temperatura óptima de 15 °C para definir ambos rangos termales (Chantre $et\ al.$, 2009b).

Las proporciones de semillas germinadas para el rango térmico sub-óptimo [3] y supraóptimo [4] fueron calculadas con las siguientes fórmulas:

$$p(T_{b(g)}) = \Phi\left[\left(\frac{T_{b(g)} - T_{b(50)}}{\sigma T_b}\right)\right]$$
 [3]

$$p(T_{m(g)}) = 1 - \left[\Phi\left(\frac{T_{m(g)} - T_{m(50)}}{\sigma T_m}\right)\right]$$
 [4]

Donde p es la proporción de semillas germinadas a una determinada temperatura (T) de la fracción g de las semillas de la población, Φ es la integral de la probabilidad normal; $T_{b(50)}$ y σT_b son la media y el desvío estándar de la distribución normal de la temperatura base respectivamente. En [4] $T_{m(50)}$ y σT_m son la media y la distribución estándar de la distribución normal de la temperatura máxima. Los parámetros termales óptimos fueron obtenidos mediante el método de ajuste de curvas no lineal de mínimos cuadrados utilizando el algoritmo de optimización Levenberg-Marquardt (Excel Solver; Frontline Systems, Inc.).

2.2.5 Análisis estadísticos

La germinabilidad de las semillas fue medida mediante la estimación de los parámetros térmicos poblacionales como se describe arriba y analizada mediante ANAVA seguido por test de Tukey (α =5%).

- Experimento I: La interacción del efecto de la disponibilidad hídrica en el ambiente materno con las fechas de post-maduración sobre las semillas de *B. arvensis* fue evaluado mediante un ANAVA doble seguido por test de Tukey.

- Experimento II: Para analizar el efecto conjunto del nivel de fertilización maternal (0, 75 y 150 Kg N ha⁻¹), el tiempo de post-maduración y el año de producción (F₁ y F₂) sobre las semillas de *B. arvensis*, se llevó a cabo un ANAVA triple seguido por test de Tukey.

2.3 Resultados

- Experimento I:

Los valores de las medias estimadas de la temperatura máxima de germinación ($T_{m(50)}$) mostraron diferencias altamente significativas entre los períodos de post-maduración en ambos regímenes hídricos proporcionados a las plantas madres (p<0,0001) (Figura 2.1A). A su vez, se manifestaron diferencias en los valores de $T_{m(50)}$ entre los regímenes hídricos, siendo mayores para la condición de estrés (H(0)) en comparación a H(+) a lo largo del proceso de post-maduración (Figura 2.1B).

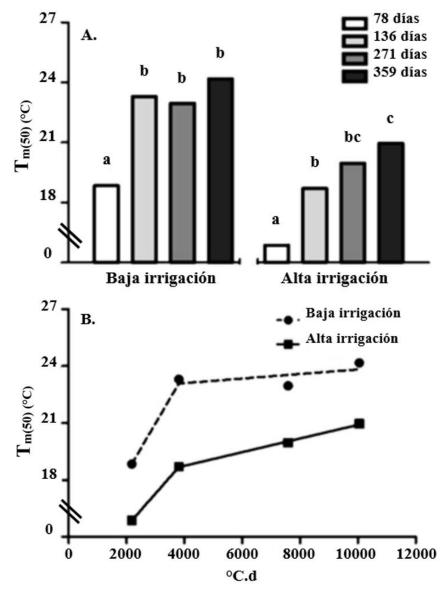


Figura 2.4 Valores de las estimaciones medias de la temperatura máxima de germinación $T_{m(50)}$ luego de 78, 136, 271 y 359 días de post-maduración para semillas de *Buglossoides arvensis*

cosechadas al momento de la dispersión natural de plantas madres sometidas a dos regímenes hídricos contrastantes (Tabla 1). A. Valores medios en cada momento evaluado. B. Norma de reacción de la temperatura media máxima.

Para ambos regímenes hídricos, una mayor tasa de incremento en la $T_{m(50)}$ fue registrada hasta los 3808 °Cd de post-maduración, mientras que dicha tasa se redujo a partir de dicho punto de inflexión (Figura 2.1B).

Tabla 2.1 Regresiones lineales entre los parámetros termales poblacionales: i) temperatura media máxima de germinación ($T_{m(50)}$), ii) tiempo térmico sub-óptimo (θ_I) y tiempo térmico de post-maduración (fase I: 2184 – 3808 °Cd; fase II: 3808 – 10052 °Cd) para semillas de *B. arvensis* recolectadas de plantas madres sujetas a dos regímenes hídricos contrastantes (H(0): baja irrigación, H(+): alta irrigación).

Parámetros t	térmicos	en cac	la períod	lo de pos	t-maduración

Parámetro	Régimen hídrico	2184-3808 °Cd (fase I)	p 3808-10052 °C (fase II)		p	
T	H(0)	Y= 13,15+0,002608x	0,181	Y= 22,62+0,0001204x	0,2638	
$T_{m(50)}$	H (+)	Y= 12,10+0,001729x	0,161	Y= 17,31+0,0003589x	0,2036	
a	H (0)	Y= 312,7-0,006825x	0.2196	Y= 78,16-0,006654x	0.1614	
$ heta_1$	H (+)	Y = 400,1-0,008961x	0,2186	Y= 79,58-0,005442x	0,1614	

El tiempo térmico sub-óptimo requerido para germinar mostró interacción entre los regímenes hídricos y las fechas de post-maduración (p<0,05). Al igual que la temperatura máxima, θ_I fue variando a lo largo del tiempo de almacenaje encontrándose diferencias entre la progenie proveniente de diferentes regímenes hídricos maternos solo en las dos últimas fechas evaluadas (Figura 2.2A). En ambos casos, la cantidad de °Cd requeridos para germinar fué menor en H(0). El comportamiento en el tiempo fue análogo a $T_{m(50)}$ manifestando un punto de inflexión a los 3808 °Cd (Figura 2.5B).

No se observaron diferencias estadísticas entre los regímenes de irrigación para las pendientes de las funciónes ajustada para cada una de las fases de post-maduración (2184 – 3808 °Cd y 3808 – 10052 °Cd) (Tabla 2.1).

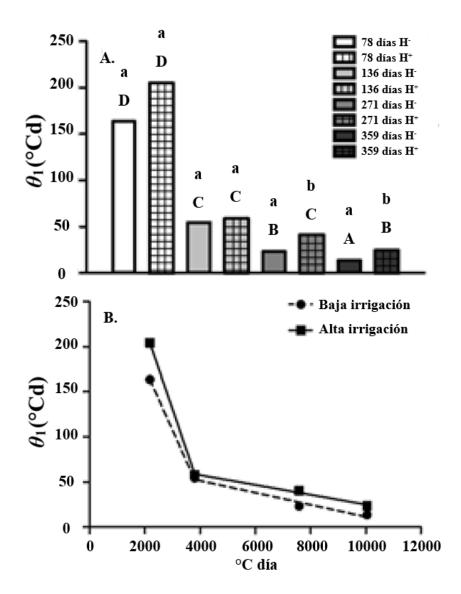


Figura 2.5 Valores de las estimaciones medias del tiempo térmico sub-óptimo luego de 78, 136, 271 y 359 días de post-maduración para semillas de *Buglossoides arvensis* cosechadas al momento de la dispersión natural de plantas madres sometidas a dos regímenes hídricos contrastantes. Columnas con letras iguales no manifiestan diferencias estadísticas según el test de Tukey (α =5%). Las letras mayúsculas indican diferencias entre los tratamientos considerando todas las fechas y las minúsculas entre los regímenes hídricos en cada fecha.

- Experimento II:

Las temperaturas diarias máximas, mínimas y promedio del aire desde el inicio de la formación de la semilla en el campo hasta que las mismas fueron cosechadas se presentan para 2012 y 2013 (Figura 2.6). Los valores medios registrados de la temperatura del aire durante la formación seminal y los del período de post-maduración sobre la planta madre fueron, en promedio, 0,3 y 8,2 °Cd más altos en el período 2011-2012 respecto de 2012-2013 (Figura 2.6).

Los parámetros térmicos poblacionales estimados para ambas generaciones $(F_1 \ y \ F_2)$ sujetas a niveles crecientes de fertilización nitrogenada se presentan en la Tabla 2.2.

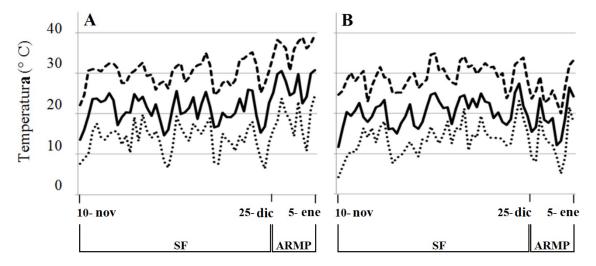


Figura 2.6 Temperaturas diarias del aire máximas (--), medias (—) y mínimas (···) en el campo durante la formación de la semilla (SF) (del 10 de noviembre al 25 de diciembre) y durante el post-maduración sobre la planta madre (ARMP) (del 25 de diciembre hasta el 5 de enero) para las temporadas (**A**) 2011-2012 y (**B**) 2012-2013.

En ambas progenies, la temperatura media máxima de germinación ($T_{m(50)}$) y el tiempo térmico de germinación requerido bajo las temperaturas sub-optimas (θ_I) fueron influenciados por el tiempo de post-maduración y los niveles de fertilización nitrogenada aplicados a las plantas madres (Tabla 1). Contrariamente, el resto de los parámetros térmicos poblacionales (i.e. $T_{b(50)}$, σT_b , θ_2 y σT_c) no fueron influenciados ni por el efecto materno ni por el período de post-maduración (p>0,10).

Como se observa en la tabla 2.2, los valores de $T_{m(50)}$ fueron fuertemente influenciados por el nivel de nitrógeno aplicado a las plantas madres y por el período de post-maduración (p<0,01). Como se indica en la tabla 2.2, mayores valores de $T_{m(50)}$ se obtuvieron al incrementar la dosis de nitrógeno.

Tabla 2.2 Parámetros termales estimados para dos generaciones sucesivas de semillas de *Buglossoides arvensis* (F_1 y F_2) provenientes de plantas madres sujetas a diferentes niveles crecientes de fertilización nitrogenada (Control, 75 kg N ha⁻¹: N(+) y 150 kg N ha⁻¹: N(++)). Las semillas correspondientes a la primera y a la segunda generación (F_1 y F_2) fueron cosechadas el 5 de enero del 2012 y 2013 respectivamente para luego ser incubadas a 5, 8, 12, 16, 20 y 23 °C luego de 90 y 380 días de almacenaje. Los parámetros fueron obtenidos según Chantre *et al.* (2009b) simulando las curvas de germinación en el tiempo y asumiendo una distribución normal tanto de T_b como de T_m en la población seminal.

Tratamiento maternal	Días de alm.	$T_{b(50)}$ (°C)	θ ₁ (°C.día)	σ_{Tb}	RMSE	$T_{m(50)}$ (°C)	θ ₂ (°C.día)	σ_{Tm}	RMSE
F ₁ (2011-2012)									_
Control	90	7,6	72,4	4,43	7,1	18,7	12,7	3,37	13,2
Control	380	7,6	38,4	4,87	8,7	22,4	28,1	9,0	9,6
N(+)	90	7,0	56,9	4,50	17,9	20,3	22,4	5,39	10,3
N(+)	380	7,6	25,6	3,31	7,8	21,9	25	7,0	13,5
N(++)	90	4,9	59,1	3,43	12,3	21,3	29,1	5,11	25,4
N(++)	380	6,1	50,9	4,13	12,0	25,0	29	7,0	10,2
F ₂ (2012-2013)									
Control	90	7,6	139,8	4,38	4,9	18,7	28,3	3,83	11,8
Control	380	4,9	19,6	1,0	24,7	22,4	22,9	4,03	12,9
N(+)	90	7,6	191,1	5,41	3,9	18,6	33,7	4,47	11,8
N(+)	380	4,9	20,5	1,11	19,1	24,0	26,1	4,08	13,6
N(++)	90	7,6	160,0	4,24	5,3	19,1	21,5	2,70	23,1
N(++)	380	4,9	17,1	1,0	20,0	26,0	27,5	5,60	12,2

Tabla 2.3 ANOVA triple para la temperatura media máxima de germinación ($T_{m(50)}$) y el tiempo térmico sub-óptimo para germinar (θ_I) evaluados según la generación (F_1 o F_2), el tiempo de almacenaje en seco, post-maduración (PD: parcialmente dormidas o ND: no dormidas) y el nivel de fertilización nitrogenada materno (0, 75 o 150 Kg N ha⁻¹).

Variable dependiente	Fuente de variación	SC	gl	CM	F	p
$T_{m(50)}$						
	Generación (G)	16,46	1	16,46	6,5	0,0152
	Tiempo de post-maduración (TA)	290,23	1	290,23	114,63	< 0,0001
	Nivel de nitrógeno maternal (N)	51,74	2	25,87	10,22	0,0003
	G * TA	0,57	1	0,57	0,22	0,6392
	G * N	5,47	2	2,73	1,08	0,3505
	TA * N	5,13	2	2,56	1,01	0,3732
	G * TA * N	1,82	2	091	0,36	0,6994
$ heta_1$,			,	,
	Generación (G)	0,28	1	0,28	21,62	< 0,0001
	Tiempo de post-maduración (TA)	2,24	1	2,24	173,79	< 0,0001
	Nivel de nitrógeno maternal (N)	$6.3^{-0.3}$	2	$1,8^{-0,3}$	0,14	0,8701
	G * TA	0,71	1	0,71	55,35	< 0,0001
	G * N	0,17	2	0,09	6,7	0,0034
	TA * N	0,07	2	0,03	2,6	0,0881
	G * TA * N	0,02	2	0,02	1,66	0,2047

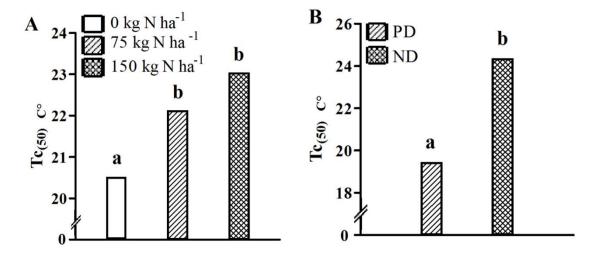


Figura 2.7 Temperatura media máxima de germinación ($T_{m(50)}$) medias de ambas generaciones obtenidas para: (**A**) los diferentes niveles de fertilización nitrogenada maternales; y (**B**) ambos períodos de almacenamiento en condiciones de laboratorio: PD, parcialmente dormidas (post-maduración parcial) y ND, no dormidas (post-maduración completo). Barras con la misma letra no son diferentes estadísticamente para un p=0,05 según el test de Tukey.

A medida que transcurre la post-maduración, los valores de $T_{m(50)}$ de la progenie aumentan (Figura 2.7B) independientemente del nivel de fertilización nitrogenada de las madres. Se observan diferencias en $T_{m(50)}$ entre las generaciones de semillas de 0,2 °C en promedio (Tabla 2.1) para los diferentes períodos de post-maduración y niveles de fertilización.

Una interacción de primer orden entre *progenie* * *tiempo de post-maduración* (p<0,0001) fue registrado para el tiempo térmico de germinación en las temperaturas sub-óptimas (θ_l ; Tabla 2.2). A medida que progresa el tiempo de post-maduración, menores valores de θ_l fueron obtenidos para ambas progenies de semillas, con los mayores requerimientos de tiempo térmico asociados a las semillas de post-maduración parcial de la F_2 (Figura 2.8A; Tabla1). Aunque la interacción *progenie* * *nivel nitrogenado* maternal fue estadísticamente significativa (Figura 2.8B; Tabla 2.2), no se observó influencia significativa respecto al ambiente nitrogenado (p=0,87). De esta manera, diferencias en los valores θ_l pueden ser atribuidas solamente a diferentes requerimientos de tiempo térmico entre las progenies (Figura 2.8B).

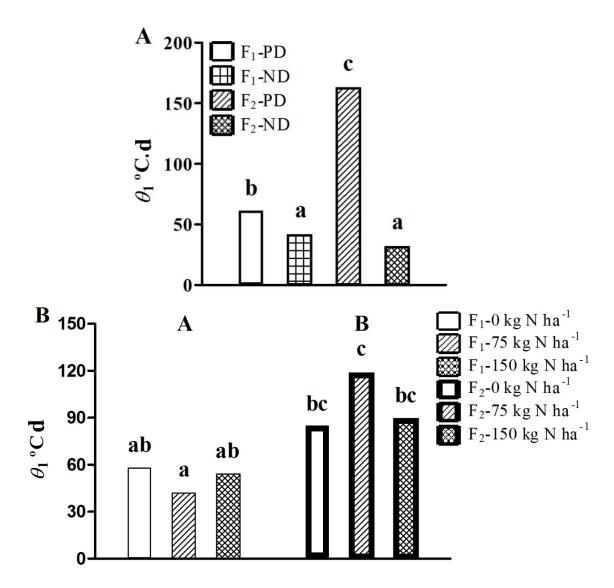


Figura 2.8 Requerimientos de tiempo térmico sub-óptimo de germinación (θ_i) para la primera y la segunda generación (F_2): (**A**) en semillas parcialmente dormidas (PD) (90 días de post-maduración) y no dormidas (ND) (380 días de post-maduración) y (**B**) para diferentes niveles de fertilización nitrogenada maternales. Barras con la misma letra no son diferentes estadísticamente para un p=0,05 según el test de Tukey. Las letras mayúsculas indican diferencias entre progenies de semillas (B) y las minúsculas entre los tratamientos evaluados (A y B).

2.4 Discusión

Mediante la implementación de modelos poblacionales se lograron cuantificar los efectos maternales de niveles hídricos y nitrogenados diferenciales sobre la germinabilidad de la descendencia de *B. arvensis*, en función del tiempo de almacenaje en seco.

Los resultados indican que, en condiciones de campo, tanto la fertilización nitrogenada como el estrés hídrico, incrementan la germinabilidad en la progenie. En ambos casos se promueve el incremento del rango térmico permisivo para germinar mediante un incremento de

la temperatura media máxima ($T_{m(50)}$) (Figura 2.4 y 2.7A). A la vez, mayores valores de $T_{m(50)}$, fueron obtenidos a lo largo del proceso de post-maduración bajo las condiciones de almacenamiento (Figura 2.4B y 2.7B).

Estos resultados coinciden con los obtenidos por Chantre *et al.* (2009b) quienes observaron que las semillas de *B. arvensis* eran capaces de germinar a temperaturas mayores de incubación tras la acumulación de tiempo térmico de post-maduración. Paralelamente, los resultados de ambos experimentos permitieron corroborar los cambios en los requerimientos de θ_I en función del tiempo de post-maduración previamente descriptos por Chantre *et al.* (2009a).

El nivel de disponibilidad hídrica influyó el requerimiento térmico cuando las semillas ya se encontraban parcial o totalmente despiertas. En el experimento II, y como se observa en la figura 2.5B, los niveles maternales de fertilización nitrogenada no influyeron sobre los requerimientos de tiempo térmico en F_1 y F_2 . Sin embargo, θ_I fue claramente más alto en la F_2 comparado con la F₁ (Figura 2.5B) principalmente debido a la post-maduración parcial de las semillas de F₂, las que mostraron los requerimientos de tiempo térmico más elevados (Figura 2.5A). Aunque una mayor germinabilidad en la progenie F₂ (i.e. menor demandas de tiempo térmico sub-óptimo; mayores valores de $T_{m(50)}$) podría ser esperada debido a la mayor presión de fertilización respecto de la F₁, otras variables ambientales, como ser la temperatura ambiente en el campo, pudieron haber influenciado los valores obtenidos. Como se observa en la Figura 2.6, las semillas de la F₁ experimentaron un período de post-maduración en la planta madre caracterizado por una mayor temperatura media y máxima del aire comparado con las experimentadas por la F₂ al siguiente año (la temperatura media del aire fue 8,2 °Cd más elevada en el período 2011-2012 comparado con el 2012-2013). De esta manera, las semillas de la F_1 pudieron haber acumulado más tiempo térmico que las semillas de la F₂ previo a ser cosechadas. Otras especies anuales, como ser A. thaliana, también mostraron un incremento en la germinabilidad cuando las semillas experimentaban mayores temperaturas en los períodos tanto previos como posteriores a ser dispersadas (Schmuths et al., 2006).

Se ha confirmado la hipótesis de que tanto la disponibilidad hídrica en el suelo como la fertilización nitrogenada de la planta madre en *B. arvensis*, influencian la germinabilidad de cada progenie. Por un lado, el estrés hídrico sufrido por las plantas madres durante el desarrollo seminal en *B. arvensis* genera una reducción en el nivel de dormición primaria de la progenie. Resultados similares fueron obtenidos en otras especies (Peters, 1982a; Perters, 1982b; Luzuriaga *et al.*, 2006; Wright *et al.*, 1999; Benech-Arnold *et al.*, 1991; Karimmojeni *et al.*, 2014). Por otro lado, la fertilización nitrogenada como efecto materno ambiental incrementó la germinabilidad en semillas de *B. arvensis*, al igual que en semillas de otras malezas (Gutterman, 2000; Fawcett & Slife, 1978; Alboresi *et al.*, 2005), siendo excepción *Sinapsis arvensis* (Luzuriaga *et al.* 2006).

Cambios en las propiedades del tejido maternal que rodea la semilla o modificaciones en compuestos celulares como hormonas, patrones proteicos o ARN mensajero pueden encontrarse

asociados al cambio de estado de semilla en desarrollo a semilla en fase germinativa (Gutterman, 2000).

La respuesta germinativa de la progenie de B. arvensis asociada al ambiente hídrico y nitrogenado de la planta madre provee algunas claves para entender el comportamiento ecológico adaptativo de esta especie bajo ambientes semiáridos. Basándose en estos resultados, se podría esperar que, ante un incremento significativo de aplicación de fertilizantes nitrogenados debido a la intensificación de la agricultura extensiva de las áreas agrícolas de la zona semiárida templada del sudoeste bonaerense, se incremente la probabilidad de ocurrencia de flujos de emergencia muy tempranos de B. arvensis a fines del verano, luego del momento de la dispersión natural de las semillas. De esta manera, la fertilización con nitrógeno en cultivos de cereales, cuando los mismos se encuentran en avanzado estado de desarrollo, podría generar que las malezas que crecen junto a ellos generen descendencia con mayor germinabilidad en comparación a lotes sin fertilizar. En la región semiárida de estudio (región de Bordenave), los valores de la temperatura media histórica finalizando el verano se encuentra en un promedio de 18,8 +/- 1,5 °C (March: 1960-2015; http://inta.gob.ar/documentos/informacion agrometeorologica-1). En promedio, los valores medios de la temperatura máxima de germinación en ambas progenies de las plantas madres fertilizadas alcanzó 19,8 °C luego de 90 días de almacenamiento en seco. De esta manera, se podría esperar que B. arvensis pueda generar, no solo la típica cohorte otoñal y de primavera temprana, sino también una cohorte más temprana durante la finalización del verano, muy pronto luego de la dispersión de semillas si se dan precipitaciones adecuadas para la emergencia y establecimiento de las plántulas.

Desde la perspectiva de control de malezas, la ocurrencia de una cohorte temprana asociada a las prácticas de fertilización nitrogenada, principalmente en los sistemas de labranza cero, podría demandar un rediseño de las tácticas de control en orden de reducir los impactos económicos y ambientales de la intervención con herbicidas. Intervenciones tempranas (i.e. antes de la emergencia del cultivo) podrían incrementar los costos operativos y también generar una mayor presión de selección sobre los biotipos resistentes de malezas. De hecho, en el 2009 se detectaron biotipos resistentes de *B. arvensis* a tribenuron-metil fueron en campos en China (Heap, 2016). Este es un asunto preocupante debido a la alta dependencia de los herbicidas inhibidores de la ALS para el control eficaz de *B. arvensis* y la posibilidad de que se produzca resistencia cruzada con otros miembros del grupo de herbicidas B/2 (inhibidores de la ALS) (e.i. metsulfuron e iodosulfuron-metil).

El desarrollo de modelos cuantitativos que predigan el cambio de la dormición y germinación de las poblaciones de semillas de malezas, pueden ser un importante método para incrementar el entendimiento del sistema, pudiendo ser utilizados pata mejorar las estrategias de control de malezas (Batlla & Benech-Arnold, 2003). Hasta donde sabemos, los modelos matemáticos no han sido utilizados previamente para analizar el efecto de la fertilización

nitrogenada como factor maternal en la germinabilidad de semillas. La importancia de considerar los efectos maternos en el desarrollo de modelos poblacionales podría permitir la cuantificación del comportamiento germinativo de la población de semillas para predecir de mejor manera los cambios en la germinabilidad seminal asociados al estado de dormición de la especie de maleza y sus implicancias ecológicas. Desde una perspectiva de manejo de malezas, la información provista por tales modelos podría ayudar a diseñar mejores herramientas de intervención y más precisas, como los modelos predictivos de emergencia de malezas (Chantre *et al.*, 2010; Blanco *et al.*, 2014) y los modelos de planeamiento operacional para el momento óptimo de intervención (Lodovichi *et al.*, 2013).

Como se mencionó previamente, no se observó evidencia de presión por parte de la fertilización nitrogenada entre progenies. Evidentemente, la variación de temperatura experimentada por las semillas durante su formación y post-maduración sobre la planta madre, pudo haber enmascarado un potencial efecto acumulativo por parte del nitrógeno sobre la germinabilidad de la progenie F₂. Estudios adicionales bajo condiciones ambientales controladas deberían llevarse a cabo durante varias generaciones sucesivas para evaluar la presión del estrés hídrico y de la fertilización nitrogenada sobre la germinabilidad de las semillas de *B. arvensis*.

CAPÍTULO III

Efecto del nivel nitrogenado materno sobre la respuesta hormonal y la germinabilidad de *Buglossoides arvensis*

3.1 Introducción

El balance entre el ácido abscísico (ABA) y las giberelinas activas (GAs) ejerce un rol clave en la dormición fisiológica, siendo el pico endógeno de ABA que tiene lugar durante la embriogénesis, el determinante del nivel de dormición post-cosecha (Le Page-Degivry *et al.*, 1990; Finch-Savage & Leubner-Metzger, 2006). En función de dicho pico, serán necesarias diferentes cantidades de GA para estimular la germinación. La cantidad relativa de estas hormonas en el momento de la imbibición determinará el pasaje a la fase III, culminado en el proceso germinativo (ver sección 1.2.1.3). Dichos niveles están sujetos a regulaciones donde interactúan los factores ambientales imperantes durante la formación de las semillas que por diferentes vías influyen en su anabolismo y catabolismo.

La cantidad de ABA presente durante la imbibición es el principal condicionante para la germinación, la cual se vería impedida si la hormona llega a cierto umbral inhibitorio. Su acumulación depende tanto de la tasa de biosíntesis como de su desactivación, catabolismo o conjugación (Jacobsen et al., 2002). En semillas despiertas de Helianthus annuus el nivel de ABA decrece aumentando el nivel de ABA conjugado como éster de glucosa (ABA-GE) durante la imbibición previo a la germinación (Andrade et al., 2009). En Hordeum vulgare paralelo a la reducción de la concentración de ABA se produce un incremento de su metabolito, el ácido faseico (Jacobsen et al., 2002). La aplicación exógena de ABA retrasa, e incluso llega a impedir la germinación, hecho observado en H. vulgare (Jacobsen et al., 2002), Arabidopsis thaliana (Garciarrubio et al., 1997) y Sinapis alba (Schopfer et al., 1979), entre otras especies. En Nicotiana tabacum L. la imbibición de las semillas en ABA retarda la germinación demorando la ruptura de las cubiertas seminales (Leubner-Metzger et al., 1996). Contrariamente, la aplicación exógena de GA₃ en cebada y lechuga estimula la germinación debido a la inducción de la síntesis de enzimas hidrolíticas y/o al estímulo directo del potencial de crecimiento del embrión (Jacobsen et al., 2002; Vidaver & Hsiao, 1974) (Figura 3.1). Estudios realizados por Ogawa et al. (2003) revelan que el nivel de GAs se incrementa antes de la emergencia de la radícula en respuesta a la aplicación exógena de GAs. En Lycopersicon esculentum la principal acción de las GAs se vincula con el ablandamiento de las células endospermáticas del área micropilar (Groot & Karssen, 1987). Debeaujon & Koornneef (2000) trabajando con Arabidopsis observaron que la remoción mecánica de las cubiertas seminales suplía los requerimientos de GAs asociados al ablandamiento de la testa. En cebada (*Hordeum distichum* L. cvs Triumph and Kristina) se comprobó la síntesis de α-amilasa mediada por las GAs. Las capas aisladas de aleurona respondieron al agregado de GA₃ secretando α -amilasa siempre y cuando las semillas estuviesen despiertas (Schuurin, et al., 1992). En Nicotiana plumaginifolia (Grappin et al., 2000) y Lactuca sativa (Gonai et al., 2004) se observó que el agregado de GA₃ inhibía la acumulación de ABA en semillas dormidas sugiriendo un rol activo de dicha hormona en el control de este proceso. Sin embargo, en semillas embebidas de A. fatua tanto despiertas como dormidas se observaron similares niveles de GA

(Metzger, 1983) disminuyendo a una tasa menor en las semillas despiertas durante la imbibición. Este hecho mostró independencia de los porcentajes germinativos de las semillas y se lo atribuye a un incremento en la capacidad de biosíntesis de dicha hormona. A su vez, se indujo la germinación con GAs exógenas, lo cual podría asociarse a una estimulación de otros procesos relacionados con la germinación (Metzger, 1983). Sin embargo, este comportamiento no es universal, pudiéndose citar, dentro de las especies con escasa respuesta a las GAs, *A. thaliana* (Ali-Rachedi *et al.*, 2004). En esta especie se observó que la síntesis de GA es requerida durante las primeras 24 horas de imbibición. Luego de dicho lapso de tiempo otras señales son necesarias para activar los genes vinculados a los estadios más avanzados de la germinación (Nambara *et al.*, 1991).

En *B. arvensis* la dormición se supera luego de un período de post-maduración en seco. Comparaciones del nivel de ABA en semillas de *N. plumaginifolia* recién cosechadas respecto de semillas almacenadas en seco revelaron una reducción del nivel de dicha hormona sugiriendo su degradación o inhibición en su síntesis (Grappin *et al.*, 2000). Este fenómeno fue citado en *H. annuus* por Bianco *et al.* (1994) y en *Taxus mairei* por Chien *et al.* (1998). Sin embargo, en algunas especies como *H. vulgare* (Jacobsen *et al.*, 2002) o *A. thaliana* (Ali-Rachedi *et al.*, 2004) no se han encontrado diferencias en el contenido endógeno de ABA entre semillas dormidas y semillas sometidas a post-maduración. Por el contrario, se han manifestado diferencias en el nivel hormonal durante la imbibición, por ejemplo, en semillas despiertas de *A. thaliana* el nivel de ABA disminuyo 3:1 en comparación con semillas dormidas (Ali-Rachedi *et al.*, 2004). Paralelamente, se ha observado una reducción en la sensibilidad del embrión al ABA por efecto de la post-maduración. Por ejemplo, en *N. plumaginifolia* semillas dormidas mostraron cuatro veces mayor sensibilidad al ABA que las despiertas (Grappin *et al.*, 2000).

La sensibilidad a GAs también varía durante el período de post-maduración. En *H. distichum* la sensibilidad de las capas de aleurona al GA₃ aumenta, al igual que los porcentajes de germinación, luego de un año de almacenamiento (Schuurin *et al.*, 1992). En *A. fatua* la sensibilidad de los protoplastos de la aleurona hacia el GA₃ es influenciada por la temperatura de almacenamiento, observándose un incremento de la sensibilidad con la temperatura y una mayor producción de α-amilasa (Hooley, 1992). Luego de ser sometidas a una post-maduración, las semillas de *A. fatua* manifestaron una mayor capacidad para producir GAs (Metzger, 1983; Taylor & Simpson, 1980). En *H. vulgare*, Jacobsen *et al.*, (2002) no observaron variaciones en el nivel de GAs ni en el de sus precursores entre semillas dormidas y despiertas sugiriendo que la cantidad de esta hormona (o de sus precursores) por sí sola no determinaría la incapacidad para germinar de las semillas de esta especie. Sin embargo, en semillas que han sido post-maduradas, al ser hidratadas y luego de un descenso en la cantidad de ABA, se registra un incremento de GAs sugiriendo su necesidad para el crecimiento del embrión en germinación (Jacobsen *et al.*, 2002).

La fluridona (FLU) (1-methyl-3-phenyl-5-[3-trifluoromethyl(phenyl)]-4-(l//)-pyridinone) es un inhibidor de la fitoeno-desaturasa, enzima que media la conversión del fitoeno en fitoflueno en la biosíntesis de carotenoides. De esta manera la ciclización de los carotenoides es inhibida acumulándose compuestos intermedios (Bartels & Watson, 1978). Los carotenoides son el principal precursor del ABA en las plantas. De este modo, la inhibición de la carotenogénesis impide la biosíntesis de ABA. En muchas especies fue observado el efecto estimulador de la germinación por parte de esta u otras drogas análogas (ej. norflurazon, diflufenican). Por lo tanto, a partir de los resultados expuestos con inhibidores de la síntesis de ABA, se infiere la síntesis de novo de dicha hormona, la cual actuaría interfiriendo en la germinación, especialmente de semillas dormidas. La lista de especies donde se ha observado este fenómeno incluye *H. annus* (Le Page-Degivry & Garello, 1992), *Arabidopsis* (Debeaujon & Koornneef, 2000), *N. plumbaginifolia* (Grappin et al., 2000), *Lolium rigidum, Sisymbrium erysimoides, S. orientale, Bromus diandrus, Ehrharta calycina, Echium plantagineum, Raphanus raphanistrum, Avena barbata* (Gaggin & Powles, 2014).

Grappin *et al.* (2000) describen un aumento del nivel de ABA endógeno en semillas dormidas de *N. plumaginifolia* luego de la imbibición (síntesis *de novo*), lo que no ocurre en aquellas que atravesaron un período de post-maduración (sin neo-síntesis de ABA). El agregado exógeno en semillas dormidas embebidas redujo el nivel de ABA alcanzando valores similares a los observados en semillas despiertas (Grappin *et al.*, 2000), análogamente a lo observado por Bianco *et al.* (1994) para *H. annuus* y por Ali-Rachedi *et al.* (2004) para *A. thaliana*. Estos antecedentes refuerzan la hipótesis de la producción *de novo* de ABA en semillas dormidas durante la imbibición. El agregado exógeno conjunto de GAs + FLU han mostrado efectos aditivos sinérgicos en semillas dormidas de *N. plumaginifolia* (Grappin *et al.*, 2000), *A. thaliana* Cvi (Ali-Rachedi *et al.*, 2004) y *R. raphanistrum* (Goggin & Powles, 2014).

Por otro lado, condiciones medioambientales desfavorables para la germinación de semillas despiertas estarían asociadas, aunque sea de modo parcial, a un aumento en la sensibilidad y/o cantidad de ABA. De hecho, la germinación de semillas despiertas es inhibida a altas temperaturas cuando la misma no es favorable para el desarrollo de la plántula, fenómeno observado generalmente en especies anuales invernales. Esta inhabilidad por parte de las semillas para germinar a temperaturas supra-óptimas se denomina inhibición a altas temperaturas o termo-inhibición (Yoshioka *et al.*, 1998). En *Lactuca sativa* la germinación se ve inhibida a partir de los 28 °C. Cantidades menores de ABA fueron necesarias para disminuir la germinación un 50% al incrementar la temperatura del medio, indicando una respuesta 6-9 veces mas sensitiva respecto de la temperatura óptima (Gonai *et al.*, 2004). Por otra parte, en semillas despiertas de *L. sativa* se correlacionaron los porcentajes de germinación a 23 y 33 °C con los valores de ABA presentes en la semilla. A 23 °C la germinación alcanzó el 100% disminuyendo el contenido de ABA velozmente luego de la imbibición. En condiciones de mayor temperatura la germinación fue casi

nula y el nivel de ABA muy superior. Sin embargo, cuando la solución de imbibición contenía un inhibidor de la síntesis de la hormona, la germinación llegaba casi a los máximos porcentajes disminuyendo la cantidad de ABA registrada. Por lo tanto, parecería que en *L. sativa* es necesaria una síntesis contínua de ABA para mantener la inhibición de la germinación a altas temperaturas (Yoshioka *et al.*, 1998). Gonai *et al.*, (2004) reportaron para la misma especie una disminución en el nivel de ABA al imbibirse la semilla tanto a 18 como a 33 °C, aunque dicha reducción fue menor a la temperatura más elevada. Es decir, la termo-inhibición en lechuga se da tanto por un mayor contenido de ABA como por una mayor sensibilidad a la hormona. La termo-inhibición superada con FLU también fue descripta en *A. thaliana* (Ali-Rachedi *et al.*, 2004).

Fenómenos análogos se han observado con otros factores ambientales. Semillas de *H. vulgare* presentaron una menor sensibilidad al ABA en oscuridad que aquellas expuestas a la luz (Jacobsen *et al.*, 2002). En *L. esculentum* reducciones en el potencial agua generan elevaciones en el nivel de ABA endógeno (Ni & Bradford, 1992). Yoshioka *et al.* (1998) observaron que la aplicación de fluridona también promueve la germinación a altas temperaturas en *Agrostis alba*, *Cerastium glomeratum*, *Chrysanthemum parthenim*, *Conyza canadensis*, *Cryptotaenia japonica*, *Dactylis glomerata*, *Festuca rubra*, *Freesia hybrida*, *Medicago sativa*, *Plantago lanceolata*, *Trifolium repens* y *Vicia angustifolia*. Tanto los rangos de temperatura como los porcentajes de respuestas variaron entre especies. Análogamente, en las especies estivales *Striga asiática* (Kusumoto *et al.*, 2006) y *L. esculentum* (Fellner & Sawhney, 2001), imbibiciones con FLU suprimirían el efecto inhibidor de las temperaturas sub-óptimas. En *L. esculentum* también se registró la superación de estrés osmótico y presencias de sales alcanzando altos porcentajes germinativos.

Sin embargo, la inducción de la germinación por parte de la FLU se da solo en un cierto rango de temperaturas (Yoshioka *et al.*, 1998). Gonai *et al.* (2004) sugieren que la termo-inhibición a altas temperaturas no es causada exclusivamente por el incremento de la biosíntesis de ABA. En *L. sativa* las semillas solo germinaron a 33 °C, alcanzando valores cercanos al 100%, al ser embebidas en solución de FLU + GAs. Es decir, FLU y GAs mostraron un efecto aditivo en la disminución del contenido de ABA, el cual fue un 50% menor que en presencia de cada compuesto por separado. Esto sugeriría que los GAs actuarían en la disminución del ABA de manera diferente que la FLU, aumentando su catabolismo (Gonai *et al.*, 2004). A su vez, la capa de aleurona de *Hordeum distichum* disminuyó la producción de α-amilasa ante el agregado de GA₃ a 20 °C respecto de 10 °C, lo que sugeriría una menor sensibilidad a la hormona a altas temperaturas (Schuurin *et al.*, 1992).

La presencia de GAs es indispensable en la germinación (Ver sección 1.2.1), evidenciándose que aplicaciones exógenas de dicha hormona permitirían la germinación bajo diferentes condiciones de estrés ambiental. Por ejemplo, la aplicación de GA₄ a semillas de *Nicotiana tabacum* L. disminuyó los efectos causados por el estrés osmótico (Leubner-Metzger

et al., 1996). Incluso, aplicaciones de GA mostraron tener la habilidad de superar los requerimientos de post-maduración, luz o estratificación. Esto sugiere que aquellos factores ambientales inducirían la biosíntesis de GA durante las fases tempranas de la germinación (Debeaujon & Koornneef, 2000). El cultivar "Havana 425" de *N. tabacum* L. requiere luz para germinar, pudiendo hacerlo a oscuras en presencia de GA₄ o en ausencia del endosperma en la zona micropilar (Leubner-Metzger et al., 1996).

De las observaciones de la respuesta ante la aplicación de inhibidores de la biosíntesis de GAs, como lo son el paclobutrazol y el tetcyclacis, se concluye que la síntesis *de novo* de GAs es requerida durante la imbibición para la germinación.

En aplicaciones de ABA junto con GAs se han observado diversas respuestas. El efecto inhibidor del ABA sobre la ruptura del endosperma y las cubiertas seminales en *N. tabacum* no fue evitado por la aplicación simultánea de GA₄ sugiriendo que dichas hormonas actúan en sitios diferentes (Leubner-Metzger *et al.*, 1996). Un efecto similar fue descripto para *N. plumbaginifolia* en donde la inhibición por ABA fue parcialmente revertida por GA₃, siendo esta última hormona aplicada en concentraciones que estimulan fuertemente la germinación en semillas dormidas (Grappin *et al.*, 2000).

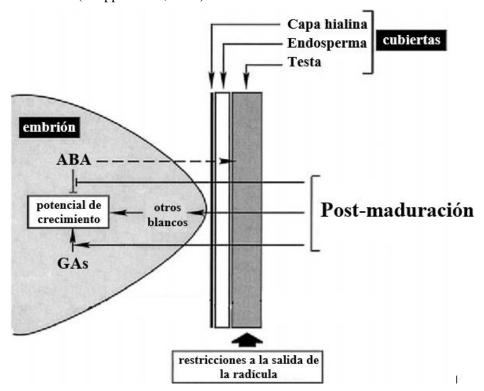


Figura 3.1 Acciones del ácido giberélico (GA) y del ácido abscísico (ABA) en la germinación y su relación con la post-maduración. Adaptado de Debeaujon & Koornneef (2000).

Como se mencionó previamente, las condiciones ambientales imperantes al momento del desarrollo seminal en la planta madre influyen sobre el nivel de dormición de la descendencia. En el presente trabajo de tesis se hipotetiza que el nivel de dormición y la germinabilidad de la

descendencia de plantas madres de *B. arvensis* sometidas a distintos niveles de fertilización nitrogenada estarían mediadas, al menos parcialmente, por regulaciones de tipo hormonal.

Se ha observado que la fertilización de plantas de *Arabidopsis* spp. con dosis crecientes de nitrógeno generaron semillas con cantidades crecientes de nitratos acumulados y decrecientes niveles de dormición (Alboresi *et al.*, 2005). Por otro lado, Benech-Arnold *et al.* (1991) describieron que las diferencias germinativas en embriones de *Sorghum bicolor* provenientes de madres sometidas a estrés hídrico y en condiciones control se vinculaba al nivel de ABA. Los embriones de madres bajo estrés germinaban a una tasa más elevada y presentaban una sensibilidad al ABA diez veces menor que aquellos desarrollados bajo óptimas condiciones hídricas (Benech Arnold *et al.*, 1991). En el pericarpio de semillas de *H. annuus* desarrolladas bajo condiciones de sequía se cuantificaron niveles mayores de ABA comparado con progenie proveniente de plantas irrigadas. Sin embargo, este hecho no se relacionó con sus respectivos porcentajes germinativos (Andrade *et al.*, 2009). En *Hordeum distichum* el nivel de dormición varió con el fotoperíodo al cual fueron sometidas las plantas madres, vinculándose este hecho con la sensibilidad de la aleurona al GA₃ (Schuurin, *et al.*, 1992).

Sobre la base del marco teórico expuesto se planteó el objetivo de cuantificar el efecto de la fertilización nitrogenada diferencial de las plantas madres de *B. arvensis* sobre la respuesta germinativa de la descendencia y la sensibilidad diferencial a la aplicación exógena de ABA, GA₃ y sus respectivos inhibidores (fluridona y paclobutrazol).

3.2 Materiales y métodos

3.2.1 Material vegetal

En diciembre de 2013 se recolectaron plantas maduras de *B. arvensis* de dos lotes situados en la estación experimental del INTA Bordenave (37°50055″S, 63°01020″O), Buenos Aires, Argentina. Uno de los lotes había sido cultivado previamente con avena (*Avena sativa* L.) y fertilizado con 100 kg N/ha (UREA granulada 46%) al macollaje. El otro lote se mantuvo sin cultivo. Se cosecharon semillas de ambos lotes, obteniéndose dos accesiones (lote fertilizado, cN) y lote sin cultivo ni fertilización, (sN). Luego de la cosecha, las semillas fueron almacenadas a temperatura ambiente hasta la fecha de siembra.

A partir de las semillas cosechadas, se generaron plantas fertilizadas diferencialmente a fin de obtener un F₂. La siembra se realizó el 16 de junio del 2014 en el predio experimental del CCT-Bahía Blanca (ver sección 1.4.2). La fertilización de las plantas provenientes del lote de avena se realizó de manera fraccionada aplicándose cuando las mismas se encontraban en estado de roseta avanzado y luego durante la floración (Alboresi *et al.*, 2005). Se aplicó UREA granulada (46% N) a razón de 50 kg N ha⁻¹ en cada oportunidad. El ensayo se estableció siguiendo un modelo completamente aleatorizado con cuatro repeticiones. En cada unidad experimental (1 m²) se

sembraron al voleo 2 g de semilla. Se cubrió la semilla con rastrojo de avena para proteger de los vientos y evitar la evaporación y se instaló un sistema de riego por goteo para evitar condiciones de sequía que pudiesen generar condiciones de estrés severo (Figura 3.2). El 15 de diciembre de 2014, cuando las semillas se encontraban en madurez fisiológica, se cosecharon manualmente, fueron trilladas y almacenadas a temperatura ambiente hasta el inicio de los ensayos de germinación.

3.2.2 Determinación del P₁₀₀₀

Las semillas cosechadas se agruparon según la unidad experimental de la que provenían quedando ocho grupos de semillas (cuatro sN y cuatro cN). De cada uno de ellos se tomaron cuatro sub-muestras de 100 unidades (8 * 4 = 32) y se pesaron en una micro balanza (± 0.0001 g) a fin de calcular el peso de mil de cada accesión.

3.2.3 Evaluación de la germinabilidad en respuesta a la aplicación exógena de hormonas

Las semillas de *B. arvensis* fueron incubadas en cámaras de crecimiento a temperaturas constantes, sub-óptima (7 °C), óptima (15 °C) y supra-óptima (20 °C) en condiciones de oscuridad. Se realizó un gradiente de ABA, GA₃, paclobutrazol y fluridona (Tabla 3.1).

Tabla 3.1 Drogas evaluadas, peso molecular (PM) y solvente utilizado en cada caso.

Droga	Detalle del producto	Fórmula empírica	PM		Solvente
ABA* (+)- Abscisic acid	ABSCISIC ACID PLANT CELL 98.5% HPLC SIGMA	C ₁₅ H ₂₀ O ₄	264,32	metanol	50 mg ABA/ml metanol
GA ₃ Gibberellic acid	plant cell culture tested, BioReagent, ≥90% GA ₃ basis (of total gibberellins.)	C ₁₉ H ₂₂ O ₆	346,37	etanol	50 mg GA ₃ /ml etanol
PAC **	PACLOBUTRAZO L MIXTURE OF STEREO ISOMERS, FLUKA	C ₁₅ H ₂₀ ClN ₃ O	293,79	acetona	0,1% acetona - H_2O
FLU	FLURIDON PESTANAL, FLUKA	C ₁₉ H ₁₄ F ₃ NO	329,32	acetona	1% acetona - H ₂ O _v / ^v

^{*(}S)-5-(1-Hydroxy-2,6,6-trimethyl-4-oxo-2-cyclohexen-1-yl)-3-methyl-(2Z,4E)-pentadienoic acid ** α -tert-Butyl- β -(4-chlorobenzyl)-1H-1,2,4-triazole-1-ethanol



Figura 3.2 Establecimiento del ensayo que generó las plantas madres del F_2 a estudiar en el predio experimental del CERZOS (CONICET-UNS) **a.** Diseño completamente aleatorizado con tres réplicas.

Treinta semillas de cada accesión (derivadas de plantas con y sin fertilizante) fueron colocadas sobre dos hojas de papel de filtro en cajas de Petri de 5,5 cm de diámetro divididas por separadores de acrílico transparente (Figura 3.3). Cada UE fue humedecida con 4 ml de solución y sellada con film para evitar evaporación. Las drogas empleadas, ABA, GA₃, PAC y FLU, fueron diluidas en agua destilada y un determinado solvente, según se indica en la tabla 3.1 (Bianco *et al.*, 1994), hasta llegar a las concentraciones de 0,01; 0,1; 1; 10; 100 y 1000 µM (Bradford & Trewavas, 1994, Gonai *et al.*, 2004). A su vez, se realizaron las siguientes combinaciones: ABA + PAC, GA₃ + FLU y ABA + GA₃, en una concentración de 100 µM. La elección de GA₃ dentro del pool de giberelinas activas disponibles se basó en antecedentes preliminares de respuesta por parte de la especie (Chantre *et al.*, 2008).

Se aplicó un DCA {2 poblaciones * [(6 dosis + testigo) * 4 drogas + 3 combinaciones] * 3 temperaturas} que se realizó por triplicado. Para la dilución de cada droga se utilizaron los solventes detallados en la Tabla 3.1. Un ensayo preliminar reveló que las dosis empleadas de cada solvente no interferían en la germinación bajo ninguna de las condiciones testeadas.

La germinación se contabilizó día por medio durante 30 días desechando las germinadas. Terminado el test se evaluó viabilidad por medio del *crush test* (Borza *et al.*, 2007) y se calculó la germinación máxima sobre semillas viables (G_{max}).

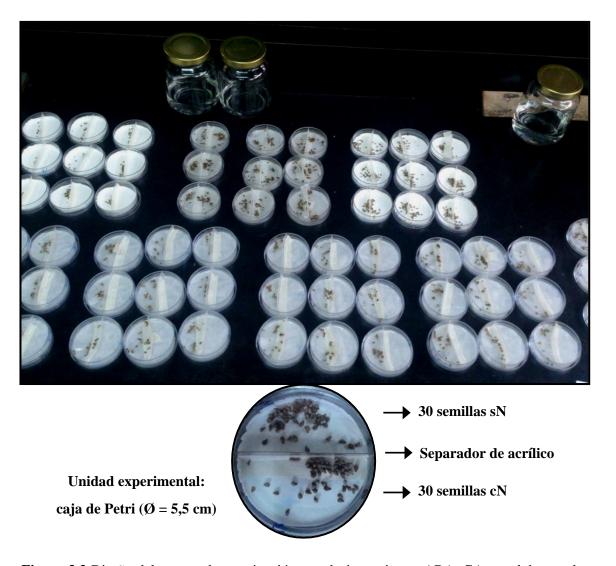


Figura 3.3 Diseño del ensayo de germinación con dosis crecientes ABA, GA₃, paclobutrazol y fluridona. Detalle de la UE dividida por un separador de acrílico transparente.

3.2.4 Análisis de datos

Para analizar el P_{1000} se realizó un ANAVA anidado a fin de evaluar un posible efecto de la UE. Dado que no se observaron efectos asociados a la UE los datos se promediaron y se realizó un ANAVA simple y test de comparación de medias (Tukey, $\alpha = 5\%$).

Los porcentajes máximos (G_{max}) de germinación sobre semillas viables se transformaron por arcoseno raíz de X para mejorar la homocedasticidad y se realizó un ANAVA simple. Al analizar las medias para cada población en cada temperatura a lo largo del gradiente de dosis de cada droga se utilizó el test de Tukey. En cada condición, las medias entre accesiones se compararon con el test de Bonferroni ($\alpha = 5\%$).

Para poder dilucidar la termo-inhibición causada a temperatura supra-óptima se realizó un ANAVA simple seguido del test de Bonferroni dentro de cada población comparando los porcentajes germinativos alcanzados con FLU y con GA₃.

La respuesta a los gradientes hormonales y de sus inhibidores se evaluó mediante curvas de dosis respuesta para cada temperatura (Firn, 1986) (ver sección 1.2.1.4.2). mediante el software GraphPad Prism® 5.01. Se calculó el G_{50} (dosis que causa un incremento o disminución del 50 % respecto al testigo). En los casos donde no se encontraron diferencias entre accesiones se agruparon los datos para describir el comportamiento general de la especie.

3.3 Resultados

Se observaron diferencias altamente significativas (p=0,0011) en el P₁₀₀₀ entre accesiones, siendo mayor en cN (P₁₀₀₀ = 4,91 ± 0,24 g) respecto de sN (P₁₀₀₀ = 4,01 ± 0,11 g) siendo los rspectivos errores estándar 0,10 y 0,09.

Los valores de $G_{\rm max}$ obtenidos bajo condiciones óptimas de germinación (15 °C) no mostraron diferencias (p=0,1638) entre accesiones. Sin embargo, cN ($G_{\rm max}$ = 72.54 ± 19.78%) presentó una clara tendencia a germinar más respecto de sN ($G_{\rm max}$ = 41,28 ± 24,75%). Este mismo resultado se observó a 20 °C (p=0,1035) alcanzando valores de 3 ± 2,64 y 14 ± 8,44 para sN y cN respectivamente (Figura 3.4). Contrariamente, este parámetro mostró significancia a temperatura sub-óptima (p=0,0053) siendo menor la germinación en para sN según Bonferroni. Comparaciones entre los testigos a 15 y 20 °C no mostraron diferencias (p=0,2762).

Ambas accesiones mostraron sensibilidad a las sustancias testeadas bajo las tres temperaturas (Tabla II.I). Si bien cN tendió a germinar en mayor proporción en todos los casos (Figura II.I), los porcentajes de respuesta para ambas accesiones fueron muy similares (Figura 3.4).

3.3.1 Sensibilidad al GA₃

En ambas accesiones y bajo las tres temperaturas de incubación se incrementaron los porcentajes germinativos conforme aumentaba la concentración de GA_3 sin observarse diferencias entre el comportamiento de las accesiones (Tabla 3.2, Figura 3.4 y II.I). Bajo incubación a temperatura óptima se necesitó una dosis ocho veces mayor para alcanzar el G_{50} en sN (Tabla 3.2). En casi todos los casos, las semillas cN germinaron en mayor porcentaje que las sN, siendo esta diferencia más acentuada a la temperatura supraóptima (Figura II.I).

3.3.2 Respuesta al paclobutrazol

Para ambas accesiones, la germinación fue estadísticamente reducida a las concentraciones más elevadas de PAC bajo condiciones de temperatura óptima y supraóptima. Los porcentajes de emergencia a 20 °C fueron nulos a partir de 0,1 μM (Figura II.I). A 7 °C se necesitó una concentración 4,5 veces superior para reducir al 50% la germinación de cN en comparación a sN.

3.3.3 Sensibilidad al ABA

El ABA mostró ser estadísticamente eficaz reduciendo la germinación hasta inhibirla en todas las temperaturas testeadas (Tabla II.I, Figura II.I). A 20 °C la germinación fue muy baja en todo el rango de concentraciones sin poder ajustarse una curva de dosis-respuesta. A temperatura subóptima la sensibilidad al ABA fue muy similar en ambas poblaciones y a 15 °C se requirió una dosis más de 12 veces superior para disminuir en un 50% la germinación en cN respecto a sN $(G_{50}=21,18 \ \mu M \ y \ 1,713 \ \mu M \ respectivamente)$ (Tabla 3.2, Figura 3.4).

Tabla 3.2 Parámetros correspondientes a las curvas de dosis respuesta de la Figura 3.4. Cuando los valores poseen valores p>0.05 no hay diferencia entre las respuestas de las diferentes accesiones (sN: sin fertilizar y cN: con fertilizante) en cada situación.

	ÁCIDO GIBERÉLICO							
	7 °C		15	°C	20 °C			
	sN	cN	sN	cN	sN	cN		
G ₅₀ (µM)	9,204	12,93	17,77	2,154	4,06	3,765		
\mathbb{R}^2	0,9588	0,5432	0,611	0,428	0,7046	0,8636		
<i>p</i> -valor	0,93	52 ^{ns}	0,07	'88 ^{ns}	0,74	73 ^{ns}		
G ₅₀ (µM) _{global}	10.	,73	6,3	804	3,9	76		
$\mathbf{R}^2_{\mathbf{global}}$	0,69	971	0,5	506	0,78	345		
				UTRAZO				
	7 '	°C	15	°C	20 '	°C		
	sN	cN	sN	cN	sN	cN		
G_{50} (μ M)	6,245	28,46	2,058	3,158	0,00011	0,0103		
\mathbb{R}^2	0,6643	0,6720	0,4371	0,3357	0,6301	0,7823		
<i>p</i> -valor	0,08	67 ^{ns}	0,9505 ^{ns}					
G ₅₀ (µM) _{global}	10.	,88	2,6	606	-			
$\mathbb{R}^{2}_{\mathrm{global}}$	0,6277 0,3928				-			
	ÁCIDO ABSCÍSICO							
	7 '	°C		°C	20 °C			
	sN	cN	sN	cN	sN	cN		
G ₅₀ (µM)	25,51	32,04	1,713	21,18	5,2*10-5	1,326		
\mathbb{R}^2		0,7820	0,4895		0,1137	0,0945		
<i>p</i> -valor	0,95	76 ^{ns}	0,12	209 ^{ns}	0,1811 ^{ns}			
G ₅₀ (µM) _{global}	28,	,58	6,694		0,0004785			
$\mathbb{R}^2_{\mathrm{global}}$	0,6	728	0,5698		0,1225			
				IDONA				
	7 °C		15 °C		20 °C	7 °C		
	sN	cN	sN	cN	sN	cN		
G_{50} (μ M)	1,473	0,7718	3,734	2,575	36,81	11,38		
R ²	0,8101	0,5206	0,7629	0,7101	0,7213	0,7358		
<i>p</i> -valor	0,36	522 ^{ns}	0,3724 ^{ns}		0,1758 ^{ns}			
G ₅₀ (µM) _{global}	1,3	314	3,166		21,34			
$\mathbb{R}^2_{\mathrm{global}}$	0,6	291	0,7	0,7262		0,6991		

3.3.4 Respuesta a la fluridona

Si bien el comportamiento ante el agregado de FLU fue muy similar en ambas accesiones (Figura 3.4) estimulando significativamente (Tabla 3.2) la germinación en todos los contextos, fue más marcado el incremento en sN (Figura II.I). A la temperatura media la respuesta ante esta droga no siguió ningún patrón siendo la germinación abruptamente reducida a 1000 µM (Figura 3.4). Bajo la temperatura supraóptima de incubación la tendencia germinativa fue creciente ante dosis mayores sin alcanzar valores elevados.

3.3.5 Aplicaciones conjuntas

La aplicación conjunta de GA_3 junto con FLU no causó efecto sinérgico ni aditivo (Figura 3.6).

En la concentración evaluada (100 μ M), al aplicar conjuntamente AG₃ y ABA hormonas, el GA₃ tendió a ejercer un efecto dominante sobre el ABA en casi todos los casos. Para cN la respuesta varió en función de la temperatura. La combinación de hormonas resultó de una germinación igual a la lograda con GA₃ solo para 7 °C y a un porcentaje intermedio a 15 °C y 20 °C.

En los casos en los que la aplicación de ABA a 100 µM no logró disminuir la germinación respecto al testigo (sN a 15 °C y cN a 20 °C), el PAC sí lo hizo y la aplicación conjunta disminuyó a niveles muy bajos, al igual que el PAC.

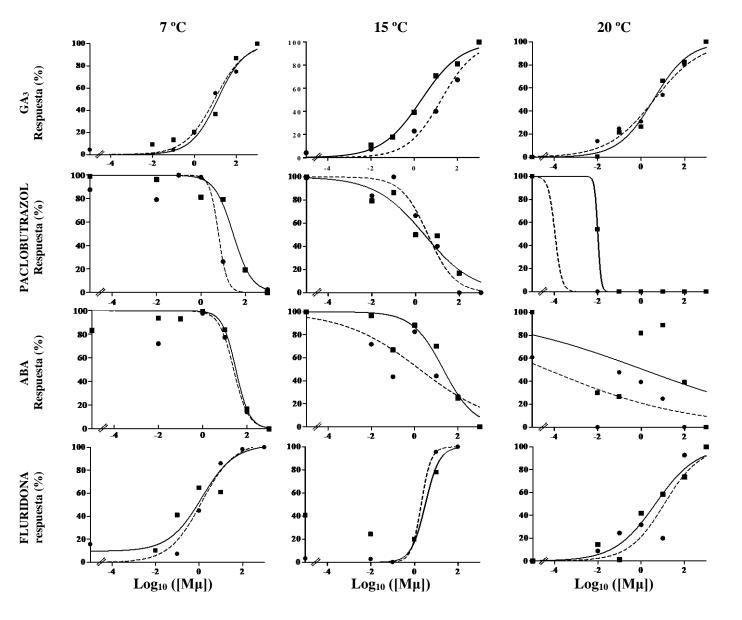
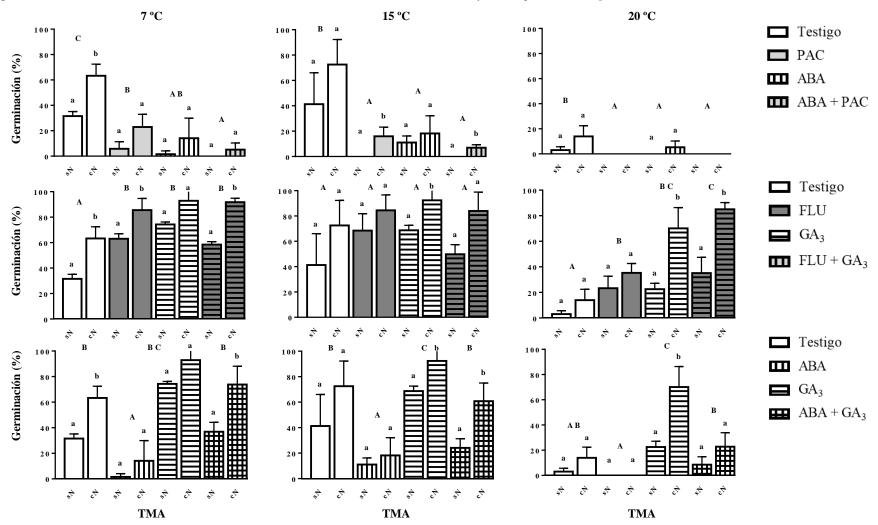


Figura 3.4 Curvas de dosis-respuesta para las accesiones provenientes de plantas sin fertilizar (----) y plantas fertilizadas (—) para las hormonas ácido giberélico (GA₃) y ácido abscísico (ABA) y sus respectivos inhibidores, paclobutrazol y fluridona.

Figura 3.5 Medias re-transformadas de arcoseno raíz de x (± ES) de la germinación máxima de la accesión fertilizada (cN) y sin la aplicación de nitrógeno (sN) bajo diferentes combinaciones hormonales y de sus inhibidores (100 μM) a las temperaturas de 7, 15 y 20 °C. Diferentes letras minúsculas indican diferencias entre accesiones en cada situación testeada según el test de Tukey. Diferentes letras mayúsculas indican distinción entre los distintos tratamientos para los casos donde previamente no se evidenció interacción entre el TMA (Tratamiento materno-ambiental) y las drogas testeadas (*p*>0.05).



3.4 Discusión

Dado que ambas poblaciones demostraron las mismas tendencias, los datos se discuten en dos secciones, inicialmente describiendo de manera general lo sucedido en la respuesta de la especie y luego las variaciones observadas debidas al efecto materno.

La aplicación exógena de GA₃ incrementó significativamente la germinación en ambas poblaciones bajo las tres temperaturas (Tabla II.I). Como sucede en numerosas especies, el endosperma de *B. arvensis* actuaría ejerciendo una resistencia mecánica que debe ser superada por el potencial de crecimiento del embrión. La imbibición en solución con GA₃ promueve la germinación (Figura 3.4) en semillas de esta especie, indicando que la hormona promovería la síntesis de hidrolasas y/o estimularía el crecimiento embrional.

La sensibilidad del embrión al GA_3 no mostró diferencias entre ambas accesiones, ni entre temperaturas evaluadas (p=0,4613) (Figura II.II). Esto indica que la sensibilidad hacia esta hormona no se ve influenciada por el factor térmico. Por lo tanto, las variaciones germinativas entre temperaturas, especialmente la disminución sufrida a supra-óptimas, tampoco están vinculadas a un cambio sensitivo hacia GA_3 .

Las reducciones en los porcentajes germinativos causados por el PAC indican que hay producción *de novo* de ácido giberélico. A medida que se incrementó la temperatura los efectos fueron más evidentes. Este hecho indicaría que la restricción para germinar sería más dependiente del GA₃ a altas temperaturas, hipotetizándose una mayor producción de ABA bajo estas condiciones.

La aplicación exógena de ABA causó una disminución dosis-dependiente en la germinación tanto en 7 °C como en 15 °C. A 20 °C, si bien hubo una disminución y hasta inhibición de la germinación, la respuesta no siguió tendencia alguna ni se diferenció entre accesiones, posiblemente dados los bajos porcentajes germinativos bajo esta temperatura. En ambos casos y para ambas accesiones, la respuesta fue totalmente inhibida en la concentración de 1000 Mμ ABA. Un comportamiento similar fue citado por Garciarrubio *et al.* (1997) en *A. thaliana*. Estos autores atribuyen el efecto inhibidor del ABA a la restricción que causa sobre la disponibilidad de energía (azúcares) y metabolitos nitrogenados para el embrión. En dicha especie, el ABA evita la degradación de proteínas de reserva.

Por lo tanto, la aplicación de GA₃ estimuló mientras que la de ABA inhibió la germinación en las dos poblaciones bajo las temperaturas evaluadas. Cuando estas hormonas se aplicaron juntas, las respuestas fueron variadas en función de la población y la temperatura (ver abajo), dejando dilucidar que el equilibrio entre ellas que marque el rumbo de la salida de la dormición va a estar influenciado tanto por el ambiente maternal como por el momento de la imbibición.

La aplicación de FLU bajo los tres regímenes térmicos incrementó la germinación de manera significativa (Tabla II.I). Este hecho es un indicio de que hay cierta producción de ABA de novo durante la imbibición. La concentración de 1000 µM a 15 °C inhibió notablemente la germinación. Este hecho pudo deberse a algún efecto fitotóxico por parte del herbicida. Bajo 20 °C la germinación se duplicó respecto al testigo. El hecho que G_{max} ronde el valor de 40% sugiere que la termo-inhibición observada en esta especie no se debería plenamente a la producción de novo de ABA. En Glycine max (Ackerson, 1984), se ha demostrado que el nivel de ABA debe bajar de cierto umbral para permitir la germinación. Que la aplicación de FLU no logre una estimulación del 100%, especialmente en sN, puede deberse a que la cantidad de ABA presente en la semilla no es solo producida de novo. De esta manera, por más que se inhiba totalmente la producción in situ, de poseer desde la embriogénesis niveles elevados de ABA, las semillas no germinarán. Se deduce que FLU no es un elemento del todo eficaz en la terminación de la dormición en semillas dormidas de B. arvensis.

Al aplicar FLU conjuntamente con GA₃ no se observó un efecto sinérgico estimulador de la germinación. De hecho, la mayoría de las veces, el porcentaje final alcanzado estuvo determinado por el GA₃. Este resultado coincide con el publicado por Song *et al.* (2006) para tres especies de *Orobanche* donde si bien tanto FLU como GA estimularon la germinación de las semillas dormidas, al aplicarlas juntas no se observó efecto aditivo. No obstante, no coincide con los resultados para *Lactuca sativa* (Gonai *et al.*, 2004). Gonai *et al.* (2004) sugieren que la termoinhibición se debe a un bajo contenido endógeno de GA acompañado por altos contenidos de ABA. Análisis hormonales en *L. sativa* revelaron que a temperaturas supra-óptimas los niveles de ABA se incrementan, pero los de GA₁ permanecen constantes. Si bien la aplicación de FLU llegó a duplicar la germinación a 20 °C, el hecho de no presentar un efecto aditivo al aplicarla junto a GA₃ genera varias inquietudes. ¿Habrá otras hormonas regulando este proceso a altas temperaturas? ¿Habrá algún impedimento que restrinja la acción de las hidrolasas o que no permita un incremento del potencial de crecimiento embrional a estas temperaturas?

Las semillas provenientes de plantas fertilizadas tendieron a expresar, bajo todos los escenarios, porcentajes germinativos mayores que las provenientes de madres sin fertilizar. Las diferencias en el nivel de dormición entre sN y cN pueden deberse a varios factores hormonales que se discutirán a continuación. Uno de ellos, es una posible diferencia en el pico de ABA durante la embriogénesis. A 20 °C, las accesiones no muestran diferencias significativas en cuanto a su germinabilidad. Este resultado es de baja confiabilidad, dada la escasa germinación (sN=3 \pm 2,64% y cN=14 \pm 8,44%) y un valor estadístico cerca de la significancia (p=0,1035).

La sensibilidad hacia GA_3 no muestra diferencias estadísticas entre accesiones (p>0.05, Figura 3.4) aunque a temperatura óptima sN alcanzó el G_{50} con una dosis 8 veces mayor, sugiriendo que este atributo no se encuentra influenciado por la fertilización nitrogenada a la planta madre. Es decir, se podría especular que no habría variación en la cantidad de receptores

presentes ni en la afinidad de la hormona hacia ellos entre accesiones. Sin embargo, sería conveniente evaluar generaciones con una mayor presión del factor evaluado (F_3 , F_4) para poder clarificar la tendencia de una mayor respuesta por parte de cN ($G_{50sN} = 2,154$ Vs $G_{50cN} = 17,77$).

Estos resultados sugieren que la sensibilidad al ácido giberélico, o al menos al GA₃, no sería el responsable de las variaciones germinativas entre ambas poblaciones.

Las curvas de dosis respuesta indicarían una tendencia por parte de sN a ser más sensibles al PAC tanto a temperaturas sub como supra-óptimas. La diferencia germinativa entre ambas poblaciones podría estar ligada a una necesidad de producir una mayor cantidad de GA₃. Este resultado coincide con el observado en *Arabidopsis* sp. por Alboresi *et al.* (2005) donde las semillas derivadas de plantas con una mayor fertilización nitrogenada mostraron ser levemente más resistentes al paclobutrazol.

A 7 °C no hubo diferencias en cuanto a la sensibilidad al ABA por parte de las dos accesiones coincidiendo este resultado con el de Alboresi *et al.* (2005). Sin embargo, bajotemperatura poptima sN manifestó una sensibilidad 12 veces mayor ($G_{50\text{sN}}=1,713~\mu\text{M}$ Vs $G_{50\text{cN}}=21,18~\mu\text{M}$). De aquí surge la hipótesis que las semillas cN podrían poseer una afinidad diferencial de receptores hacia la molécula de ABA (Firn, 1986), dado que concentraciones variables de nitrógeno podrían influir en la composición de las proteínas presentes en las membranas. La capacidad de un tejido ante un nivel dado de ocupación de receptores y la eficiencia de toma como de transporte al sitio de acción (Firn, 1986) son otros aspectos que podrían verse influenciados por el ambiente materno.

Para poder probar las hipótesis sobre el rol del ABA en la regulación de la dormición, permitiendo o no la germinación, deberían realizarse diversos estudios dadas las múltiples funciones que ejerce en diferentes especies. Por ejemplo, en *Sinapsis alba* el ABA inhibe la germinación controlando la toma de agua por los tejidos embrionales y no por controlar la síntesis de algún metabolito (Schopfer *et al.*, 1979).

Ambas accesiones describen curvas idénticas para las diferentes concentraciones de FLU y GA₃. El sistema presentaría una capacidad de respuesta limitada (Firn, 1986), donde ambas sustancias estimulan la germinación. La respuesta se incrementa con la dosis hasta una concentración, dependiente de la accesión, en donde la sustancia satura la respuesta. Dado que cN presenta una dormición primaria menos profunda, el incremento de dosis de GA₃ permite alcanzar en el rango de dosis evaluado, mayores porcentajes germinativos.

A partir de estos resultados surgen varias inquietudes y preguntas respecto al agente determinante de la diferencia innata en la dormición de ambas accesiones. ¿Hubo diferencias en el pico de ABA durante la embriogénesis en los dos escenarios maternos? En dicho caso ¿Cómo induciría el nitrógeno tal respuesta? ¿Habrá algún compuesto que genere diferencias sensibles durante la embriogénesis que desencadenan respuestas diferenciales ante un mismo pico de ABA? Bethke *et al.* (2006) detallan como el óxido nitroso (NO) rompe la dormición en *Arabidopsis* sp.

bajo la hipótesis de una disminución en la sensibilidad hacia el ABA. ¿Será que un ambiente con mayor disponibilidad de nitrógeno conduce a una mayor acumulación de algún compuesto nitrogenado que acelera la degradación del ABA? Diferentes tratamientos sobre embriones de Glycine max revelaron la tendencia de incrementar la germinación al disminuir el ABA remanente del pico producido durante la embriogénesis (Ackerson, 1984). En Arabidopsis sp., los nitratos acumulados en semillas de plantas madres fertilizadas no afectaron la imposición de la dormición sino su mantenimiento en las semillas maduras (Alboresi et al., 2005) dando lugar a la hipótesis de que los nitratos podrían llegar a estar relacionados con el catabolismo del ABA. Previamente, Ali-Rachedi et al. (2004) proponen una hipótesis semejante donde los nitratos estimularían el catabolismo oxidativo del ABA. Si bien lo proponen para la aplicación externa, podría tratarse de un mecanismo análogo durante la embriogénesis ¿Será el nitrógeno un mensajero que active/desactive algún gen vinculado con la dormición? Alboresi et al. (2005) proponen que los resultados análogos que encontraron en Arabidopsis sp. pueden deberse a que los nitratos actúan como una señal, o producen algún compuesto relacionado, y se vinculan al gen NRT1.1, quien contribuiría a su absorción y aliviaría el nivel de dormición en las semillas que más los acumulan: aquellas provenientes de plantas madres fertilizadas. ¿Causará el nitrógeno disponible durante la formación seminal cambios estructurales o en la composición del endosperma que generen diferentes requerimientos hormonales para poder disolverlo o ser atravesado por el embrión? Varios ejemplos detallan como las propiedades de las envolturas seminales se asocian con la dormición (Graeber et al., 2012). Por ejemplo, si bien la degradación de las paredes celulares del endosperma, que causan pérdida de rigidez, no es necesario que sea total sino lo suficiente como para permitirle a la radícula atravesarla (Groot & Karssen, 1987), un embrión con menor potencial de crecimiento necesitará un mayor estímulo para superar dicha barrera o que la misma sea más degradada. Lo anterior, en ambos casos, seria generado por una mayor cantidad o sensibilidad hacia GAs. ¿Habría más hormonas participando del control de la dormición y/o germinación? En Orobanche aegyptiaca, O. ramosa, y O. minor, "brassinolide" no solo estimula la germinación de semillas dormidas, sino que tiene un efecto aditivo al ser aplicado junto a GA₃ o FLU (Song et al., 2006). Ensayos de mediciones hormonales durante la embriogénesis e imbibición seminal, como cortes histológicos podrían ayudar a dilucidar este tema.

Desde el punto de vista ecológico y ante resultados similares, Alboresi *et al.* (2005) hipotetizan que en ambientes donde limita el nitrógeno, la planta madre censaría esta carencia e influiría incrementando el nivel de dormición de la progenie a modo de evitar la germinación en ambientes desfavorables. De este modo, ante un medio más adecuado (como ser con mayor disponibilidad nitrogenada en el suelo), las semillas con dormición podrán ser estimuladas a germinar. Esta señalización seria parte de un proceso de adaptación al medio.

Varios trabajos se están realizando en orden de aplicar controles estratégicos usando a fluridona, u otro análogo para realizar un manejo de malezas estratégico. Ejemplos incluyen la

promoción de "germinaciones suicidas" en plantas parásitas en ausencia de hospedantes (Song *et al.*, 2006) o germinaciones sincronizadas para ejercer luego un control sistemático y así poder agotar el banco de semillas del suelo (Goggin & Powles, 2014).

CAPÍTULO IV

Efecto de la disponibilidad hídrica y nitrogenada de las plantas madre sobre las características morfo-fisiológicas de las semillas y plántulas de la progenie

4. 1 Introducción

Las plantas responden típicamente a las condiciones locales con cambios plásticos, morfológicos y/o fisiológicos, que aumentan el éxito individual (Galloway, 1995). El "efecto materno" o "efecto ambiental materno" condiciona a la progenie a un cierto ambiente según las experiencias vividas por la planta madre. En otras palabras, los factores ambientales imperantes durante la formación de las semillas pueden influenciar directamente en ellas afectando de diversas maneras sus atributos, o pueden hacerlo indirectamente al condicionar características morfo-fisiológicas maternas que se correlacionan con las de la descendencia (Donohue, 1999; Karimmojeni *et al.*, 2014). De esta manera, el ambiente materno influye sobre atributos de la descendencia indirectamente cuando se correlacionan con características morfo-fisiológicas maternas (Figura 4.1A), o directamente cuando es el medio el que ejerce un efecto sobre la progenie (Figura 4.1B). Esta última situación tiene lugar especialmente durante la formación de las semillas en la planta madre.

Un ejemplo clásico de plasticidad fenotípica es la variación en biomasa ante diferente disponibilidad de recursos. Por ejemplo, Sinapsis arvensis desarrolló una menor biomasa aérea bajo una disponibilidad hídrica reducida (Wright et al., 1999). El tamaño de la planta madre se correlaciona con el fitness al dar lugar a distintas cantidades y/o pesos de semillas (Hendrix, 1984; Wolf et al., 1986; Aarssen & Burton, 1990; Pigliucci et al., 1995; Donohue, 1999; Halpern, 2005) lo cual ejerce un efecto sobre la habilidad de las especies para persistir en tiempo y espacio (Schaal, 1980). Pueden citarse varios ejemplos del efecto maternal sobre la producción de semillas, tanto en número como en tamaño, en plantas madres sometidas a diferentes condiciones ambientales. Por ejemplo, bajo una menor irrigación se registró una menor cantidad de semillas en Lolium rigidum (Steadman et al., 2004) y en S. arvensis (Wright et al., 1999). Debido al estrés hídrico Mimulus guttatus redujo el tamaño seminal (Galloway, 1995) y Sorghum bicolor presentó una menor tasa de acumulación de peso seco alcanzando ²/₃ del peso final de las semillas generadas sin limitaciones hídricas (Benech-Arnold et al., 1991). Al aumentar la disponibilidad de nutrientes se incrementó el peso y la variación en tamaños dentro de un mismo individuo en plantas de Desmodium paniculatum (Wulff, 1986a). Es de importancia recalcar que no siempre las mayores dimensiones seminales se deben a un mayor almacenaje de reservas. El incremento en peso puede deberse, entre otras causas, a mayores dimensiones de los tejidos que rodean la semilla como ocurre en Plantago lanceolata cuando el desarrollo seminal acontece a menores temperaturas (Lacey et al., 1997).

El primer ambiente que experimenta una planta se da durante su desarrollo seminal, el cual consta de las condiciones imperantes del medio (temperatura, luminosidad, etc.) (Figura 4.1A) sumado al fenotipo materno (lugar físico donde se está formando la semilla), incluyendo su estatus hídrico y nutricional (Donohue, 1999). La ubicación en la planta madre, inflorescencia o posición

en el fruto donde se genera dicha semilla puede influir, en diferentes proporciones, en el tamaño seminal. Diferencias en peso de 1,2 a 10 veces se han registrado, dentro de una misma planta o población, en diferentes especies (Schaal, 1980; Hendrix, 1984; Wolf *et al.*, 1986; Wulff, 1986a; Choe *et al.*, 1988; Vaughton & Ramsey, 1998; Halpern, 2005) encontrándose influencia, en muchas ocasiones, también debido a los factores ambientales (Winn, 1988).

Las dimensiones seminales pueden relacionarse con múltiples atributos de la semilla, como el nivel de dormición, germinación y emergencia, y de la plántula influyendo en la demografía poblacional (Hendrix, 1984). En un amplio número de especies se ha reportado que las semillas de mayor tamaño tienden a expresar mayores tasas y/o porcentajes germinativos (Schaal, 1980; Stanton, 1984; Weller, 1985; Hendrix & Trapp, 1992; Galloway, 2001; Halpern, 2005). Sin embargo, estas tendencias no son regla fija habiéndose registrado respuestas variables en diversas especies (Kalisz, 1989; Vaughton & Ramsey, 1998; Baloch *et al.*, 2001; Luzuriaga *et al.*, 2006).

Generalmente una mayor producción de semillas se relaciona con un menor tamaño de las mismas. La teoría del "trade-off" asume la existencia de una finita y relativamente fija cantidad de recursos en un determinado tiempo (Wolf et al., 1986). Entre inflorescencias, flores en una misma inflorescencia u óvulos en un mismo ovario suele manifestarse una competencia local. A su vez, ante condiciones limitantes de recursos, se han reportado estrategias de ajuste diferencial entre la cantidad y el tamaño de simientes (Schmid & Dolt, 1994; Vaughton & Ramsey, 1998). Si bien la tendencia del trade-off se ha observado ampliamente (Wolf et al., 1986) hay excepciones (Schaal, 1980; Halpern, 2005). Cabe recordar, que el tamaño seminal óptimo es aquel que maximiza el retorno por unidad producida, semillas de menor tamaño tendrán un bajo fitness mientras que aquellas mayores al óptimo serán una pérdida de recursos que podrían haber sido utilizados para provisionar más descendencia (Vaughton & Ramsey, 1998).

Las consecuencias del tamaño seminal sobre la futura plántula van más allá de la mera disponibilidad nutritiva, correlacionándose con atributos morfo-fisiológicos que condicionarán la supervivencia del individuo, incluso en estadios avanzados de desarrollo. En general, semillas de mayor tamaño dan lugar a plántulas más grandes (Schaal, 1980; Howe & Richter, 1982; Staton, 1984; Weller, 1985; Wulff, 1986b; Choe *et al.*, 1988; Hendrix *et al.*, 1991; Schmid & Dolt, 1994; Vaughton & Ramsey, 1998; Halpern, 2005) pudiendo influir en sus habilidades competitivas (Wulff, 1986c). Las consecuencias morfológicas generadas a partir de diferentes tamaños seminales, pueden variar en asociación con las características de la historia de vida y/o las condiciones ambientales (Halpern, 2005). El mayor tamaño de las plántulas generadas de semillas más grandes perdura hasta el primer mes de emergidas (Staton, 1984; Hendrix *et al.*, 1991) pudiendo incluso manifestarse aun en el estado adulto (Wulff, 1986c; Winn, 1988).

El fenotipo de la descendencia no es solo influenciado por el fenotipo materno (Figura 4.1A) y su ambiente (Figura 4.1B) sino también y principalmente, por el ambiente que el propio individuo vivencia durante su ciclo de vida. Es decir, que el ambiente experimentado por la

descendencia puede influir en la expresión fenotípica (Figura 4.1C) (Donohue, 1999). Por ejemplo, una fertilización diferencial incidió sobre la velocidad y los porcentajes finales de germinación de semillas de *Plantago major* manifestándose diferencialmente según la competencia presente (Miao *et al.*, 1991). En *D. paniculatum* la diferencia en peso seco y área foliar entre las plántulas procedentes de semillas de diferentes tamaños se magnificó al ser incubadas en un medio enriquecido nutritivamente. Las plántulas originadas de semillas más grandes expresaron una respuesta proporcionalmente mayor en su crecimiento en comparación con plántulas generadas a partir de semillas de menor tamaño (Wulff, 1986b). Por lo tanto, la dirección y magnitud de los efectos maternales van a estar determinadas tanto por la plasticidad materna como por la de la descendencia (Donohue, 1999).

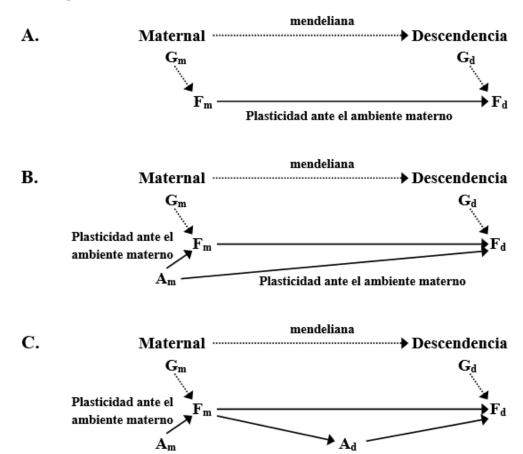


Figura 4.1 Influencias maternas sobre el fenotipo de la progenie. Las flechas negras señalan los efectos maternos mientras que las líneas punteadas la descendencia mendeliana. F representa al fenotipo, G menciona al genotipo y con la letra A se indica el ambiente. El subíndice m hace referencia a la planta madre y el d a la descendencia. **A**. Efecto del fenotipo materno: atributos de la descendencia responden directamente al fenotipo de la planta que les dió origen. **B**. Efecto del ambiente maternal: características maternas responden al ambiente circundante influyendo en su progenie. La descendencia puede ser afectada directamente por dichos factores ambientales. **C**. Efecto del ambiente de la progenie: el fenotipo de la descendencia se ve influenciado por su propio entorno afectando la manifestación del efecto materno. Adaptado de Donohue, (1999).

El objetivo principal del presente capítulo fue determinar posibles efectos del ambiente materno sobre las características de la progenie de *B. arvensis*.

En este capítulo se analizaron diferentes atributos de la descendencia provenientes de dos Ubicaciones diferentes en la misma Planta Madre (UPM), las que fueron generadas bajo diferentes condiciones de disponibilidad hídrica y nitrogenada dando lugar a los Tratamientos Maternos Ambientales (TMA).

4. 2 Materiales y Métodos

4.2.1. Esquema sintético

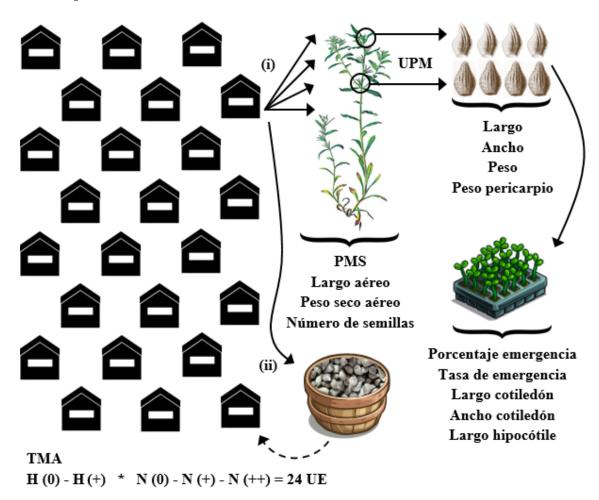


Figura 4.2 Esquema del trabajo realizado. TMA: Tratamiento Materno Ambiental, siendo H(0): baja y H(+): alta disponibilidad hídrica y N(0): 0, N(+): 75 y N(++): 150 kg N ha⁻¹. (i) Selección al azar de cuatro plantas madres por UE, cortadas al ras del suelo. De las mismas se extrajeron cuatro semillas apicales y cuatro basales que luego de medir diferentes atributos morfológicos se pusieron a emerger. Este procedimiento se siguió tanto para la F_1 como para la F_2 . (ii) Cosecha del resto de las semillas producidas por UE, las que fueron re-sembradas para dar origen a la siguiente generación (F_2). N=24 (n=4).

En el presente capítulo se expone un experimento que involucra dos generaciones sucesivas de *B. arvensis* (F₁ y F₂) desarrolladas en seis ambientes diferentes. En una primera etapa se generaron plantas madres bajo distintas condiciones hídricas y nitrogenadas y al momento de la cosecha se siguieron dos protocolos. En cada UE: (i) se seleccionaron cuatro plantas al azar (pseudoréplicas, PMS: Planta Madre Seleccionada) (Figura 4.2) sobre las que se midió la biomasa aérea para establecer posibles correlaciones con atributos de la progenie. De cada PMS se tomaron al azar ocho semillas procedentes de dos ubicaciones diferentes dentro de la planta, para su análisis morfo-fisiológico (ver sección 4.2.4); (ii) se cosecharon el resto de las plantas producidas unificando en un solo pool sus semillas para realizar la siembra al año siguiente dando origen a la F₂.

4.2.2 Recolección del material original

Las semillas utilizadas para generar las plantas madres en 2012 fueron colectadas en diciembre de 2011 de un lote experimental del INTA-Bordenave (37°50′55"S, 63°01′20"O). Se recolectaron plantas senescentes y se las trilló manualmente. Las semillas fueron almacenadas en bolsas de papel a temperatura ambiente hasta el inicio del ensayo al año siguiente.

4.2.3 Producción de las plantas madres

Las plantas madres fueron cultivadas en el predio del CERZOS (sección 1.4.2). Previo a la instalación del ensayo el terreno fue arado. Luego, 24 UE de 1 m² fueron regularmente distribuidas a 1 m de distancia entre ellas a modo de evitar efectos de sombreado (Figura 4.3). Cada UE estuvo conformada por una estructura de hierro forrada en nylon. En la base se realizaron perforaciones para permitir la percolación del agua. La parte superior se trataba de un techo a dos aguas que permitía su apertura mediante un enganche y de este modo facilitar la ventilación y el descenso de temperatura en días muy calurosos. Aberturas alrededor permitían la libre circulación del aire y evitaban un posible efecto invernadero. La siembra en cada UE se realizó manualmente y al voleo, esparciendo 250 g de semilla sobre la cual se tamizó tierra hasta cubrir 1,5 cm.

4.2.4 Tratamientos de efecto materno

Las diferentes condiciones ambientales que se le aplicaron a las plantas madres trataron de tres niveles nitrogenados (N(+): 75 y N(++): 150 kg N ha⁻¹) más el testigo (N(0): 0 kg N ha⁻¹) y dos condiciones hídricas (H(+): alta y H(0) baja) resultando en un total de seis tratamientos (TMA). Se siguió un modelo completamente aleatorizado con cuatro repeticiones dando en total 24 UE (Figura 4.3).

La fertilización se realizó de manera fraccionada aplicando la mitad de la dosis en estado de roseta (~ cinco pares de hojas en el tallo principal) y la otra mitad en floración. El fertilizante

utilizado fue UREA granulada (46% N). El riego se realizó manualmente el primer año y el segundo se aplicó un sistema de riego por goteo.

La cantidad de plantas promedio logradas por unidad experimental fue de 77 para el 2012 y de 181 para el 2013. No se encontraron diferencias significativas para el número de plantas UE^{-1} debido al ambiente materno (p>0.05).

Con el fin de evaluar el posible efecto morfo-fisiológico debido a la UPM de cada PMS se tomaron ocho semillas. Como el patrón de floración no es claro (ver sección 1.1.2), no se consideró a la inflorescencia como fuente de variación seminal (Hendrix & Trapp, 1992; Schmid & Dolt, 1994) tomando cuatro semillas basales y cuatro apicales del tallo principal indistintamente de las ramificaciones con inflorescencias que pudiera haber entre ellas.



4.2.5 Evaluación morfométrica de las plantas madres

Al final del ciclo de la maleza se seleccionaron al azar en cada UE, cuatro PMS obteniendo un total de 96 plantas por año (4 plantas * 6 tratamientos * 4 repeticiones). Las mismas fueron almacenadas en bolsas de papel a temperatura ambiente.

De cada planta se pesaron todas las partes aéreas remanentes. Se trataba principalmente de tallos dado que son pocas las hojas que quedan adheridas a la planta (Figura 1.3). Además, se midió el largo de los tallos principales y sus ramificaciones para poder determinar su densidad aérea (DA), relación entre el largo y el peso. Finalmente, se contabilizó el número de semillas producido por planta.

Figura 4.3 Unidades experimentales donde se cultivaron las plantas madres siguiendo un DCA (N = 24, n = 4).

4.2.6 Evaluación morfométrica seminal

De cada PMS se tomaron cuatro semillas apicales (Ap) y cuatro basales (Ba), a fin de evaluar un posible efecto de la ubicación (UPM). Se colectaron 768 semillas por año (6 tratamientos * 4 plantas * 8 semillas * 4 repeticiones).

El tamaño seminal se evaluó mediante el peso y el cálculo del perímetro (eq. 1) que rodea la superficie seminal donde queda expuesta la unión carpelar. La forma de la semilla de B. *arvensis* corresponde a un triángulo isósceles sobre un trapecio isósceles (Figura 4.4). Esta forma se mantiene en todas las semillas de manera muy similar (observación personal). La base menor del trapecio posee aproximadamente $\frac{3}{4}$ del valor de la base mayor. Además, $\frac{2}{3}$ del total del largo seminal se le atribuye a la altura del triángulo isósceles y $\frac{1}{3}$ a la del trapecio. Se asume que la parte más ancha de la semilla es la base del triángulo y la base mayor del trapecio (Figura 4.4).

Cada semilla fue rotulada individualmente, pesada en balanza analítica (\pm 0,0001g) y medida con un micrómetro analítico (ancho: A y largo: L). Con los datos de A y L se calculó un índice de forma (IF= A/L) tomando valores cercanos a 1 para las semillas esféricas y de 0 para las más alargadas. El perímetro seminal se calculó en base a la siguiente fórmula:

$$Psem = \left[\sqrt{(\frac{1}{2}A)^2 + (\frac{2}{3}L)^2} \right] * 2 + \frac{3}{4}A + \left[\sqrt{(\frac{\frac{1}{4}A}{2})^2 + (\frac{1}{3}L)^2} \right] * 2$$
 (1)

Donde *Psem* es el perímetro seminal, A el ancho y L el largo.

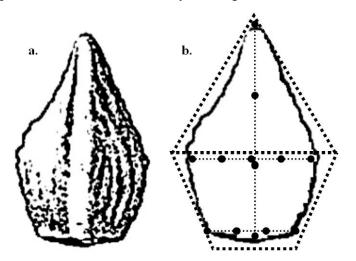


Figura 4.4 Semilla de *Buglossoides arvensis*. **a**. Superficie rugosa exhibiendo la unión carpelar. **b.** Perímetro seminal (triángulo isósceles dispuesto sobre un trapecio isósceles) y la relación ancho/largo.

A su vez, se extrajo el pericarpio de las semillas que germinaron (Figura 4.5b), se dejó expuesto a temperatura ambiente por 48 horas y se lo pesó en balanza analítica (\pm 0,0001g). El

peso y porcentaje del peso fresco del embrión se calculó con la diferencia entre este dato y el peso de la semilla antes de ser sembrada.

4.2.7 Evaluación ecofisiológica de la descendencia

Para poder determinar si los atributos medidos en las plántulas provenían exclusivamente del contenido seminal y no eran generados *in situ* por fotosíntesis o tomados del medio, las semillas individualmente identificadas fueron sembradas a 1,5 cm de profundidad en plantineras (Figura 4.8b), regadas con agua desmineralizada e incubadas a un régimen constante de temperatura de 15 °C en oscuridad. La emergencia se contabilizó diariamente durante 30 días bajo luz verde.



Figura 4.5 Semilla germinada de *Buglossoides arvensis*. **a**. Embrión germinado con la radícula alargada. **b.** Pericarpio.

4.2.8 Evaluación morfométrica de las plántulas

Al momento de contabilizar la emergencia se tomaron las dimensiones de cada plántula. Con micrómetro analítico se midió el largo y ancho del cotiledón y el largo del hipocótile. Asumiendo que la forma del cotiledón es oval, su perímetro fue calculado mediante la siguiente ecuación:

$$P\cot i \cong \pi \left\{ 3(a+l) - \sqrt{[(3a+l)(a+3l)]} \right\}$$
 (2)

Donde *Pcoti* es el perímetro del cotiledón y, a y l el ancho y largo respectivamente.

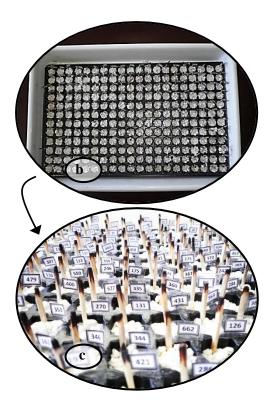




Figura 4.6 Ensayo de emergencia. **a, b.** Incubación en bandejas conteniendo sustrato a base de perlita. **c.** Rotulación individual para cada individuo.

4.2.9 Análisis estadísticos

Los efectos maternos evaluados: disponibilidad hídrica, fertilización nitrogenada y ubicación en la planta se analizaron mediante ANAVA triple. Cuando la interacción triple fue significativa (p<0,05), se realizaron ANAVAs dobles. ANOVAs simples se realizaron en los casos donde los ANAVAs dobles mostraron significancia. Para evaluar el efecto de UPM dentro de cada TMA se realizaron ANAVAs simples particionados por TMA en cada generación independientemente. En los casos donde se manifestaron diferencias significativas se prosiguió con el test de Tukey.

ANAVAS anidados se llevaron a cabo a fin de evaluar una posible influencia de la UE. En los casos donde no hubo significancia estadística (p>0.05) los datos se agruparon (n=16: 4 plantas * 4 réplicas, por tratamiento).

La evaluación de la relación entre la producción de semillas y la biomasa aérea producida se realizó mediante regresión lineal particionado por año y TMA. En los casos en que todos los TMA daban significativos se agruparon ambos años.

Para examinar la relación entre la biomasa seminal total, el peso del embrión y el tamaño de la plántula resultante (cotiledón y largo de hipocótile) se utilizaron análisis de regresión lineal.

Para cumplir con los supuestos de homocedasticidad y normalidad los datos de producción de semillas, largo, peso y la relación peso/largo de las plantas madres; IF seminal, PF pericarpio

sufrieron una transformacion logaritmica y los porcentajes de emergencia y de semillas viables con arco-seno raíz.

4. 3 Resultados

4.3.1 Evaluación morfométrica de las plantas madres

Como se observa en la tabla 4.1, el nivel hídrico afectó todos los atributos medidos en las plantas madres en ambas generaciones, ocasionando menores valores en condiciones de estrés hídrico y de menor disponibilidad nitrogenada (Figura III.I-II), aunque este último factor se manifestó a partir de la F₁. La producción de semillas fue afectada por el régimen hídrico (Tabla 4.1; Figura 4.7), aumentando el número de semillas promedio por planta en H(+).

Tabla 4.1 Valores estadísticos (F) para los caracteres evaluados en las plantas madres según los tratamientos ambientales impuestos: N: fertilización nitrogenada y H_2O : disponibilidad hídrica.

Atributo por planta	año	$N * H_2O$	N	H ₂ O
T asses Asilia	2012	0,87 ^{ns}	2,47 ^{ns}	17,22***
Largo tallo	2013	0.64^{ns}	5,95**	31,55***
D 4 II	2012	$0,26^{ns}$	$1,57^{ns}$	27,70**
Peso tallo	2013	$0,23^{\text{ ns}}$	7,69**	12,53**
T D.	2012	1,01 ^{ns}	1,79 ^{ns}	0.11^{ns}
$\mathbf{Log_{10}}\ \mathbf{DA}$	2013	$0.03^{\rm ns}$	$1,78^{ns}$	8,54**
Producción de	2012	$0,24^{\text{ns}}$	0.8^{ns}	16,71**
semillas	2013	2,4 ^{ns}	0,45 ^{ns}	14,89**

El análisis de regresión reveló una relación lineal entre la producción de semillas con la producción de biomasa aérea, indistintamente del atributo evaluado (Tabla 4.2).

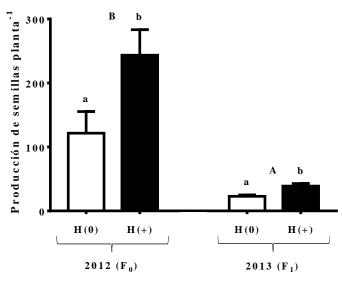


Figura 4.7 Medias $(\pm ES)$ transformadas del logaritmo número de semillas por planta según el tratamiento materno ambiental de disponibilidad hídrica (H(0): baja, H(+): alta) para F_0 (2012) y F_1 (2013). Letras mayúsculas comparan resultados entre años y minúsculas entre tratamientos hídricos en cada año. Diferentes letras indican diferencias estadísticamente significativas según el test de Tukey $(\alpha = 5\%).$

Tabla 4.2 Regresiones lineales de la producción de semillas de *Buglossoides arvensis* según el largo o el peso del tallo bajo los diferentes tratamientos maternos ambientales de disponibilidad hídrica (H(0): baja y H(+): alta) combinados con un gradiente de fertilización nitrogenada (N(0): 0, N(+): 75 y N(++): 150 kg N ha⁻¹). Las regresiones fueron calculadas en promedio para los dos años.

TMA	X = Largo aéreo de la planta madre (cm)					
IWA	Fórmula	Rango X	\mathbb{R}^2	F		
H(0) N(0)	N° sem= $0.3764X + 2.764$	[4;1172,6]	0,93	387,7***		
H(0) N(+)	N° sem= 0,3932X - 7,87	[29,1;673]	0,79	88,1***		
H(0) N(++)	N° sem= 0,7914X + 26,52	[29,2;920,1]	0,38	16,4***		
$\mathbf{H}(+) \mathbf{N}(0)$	N° sem= 0,4631X + 0,866	[21,7; 1462,9]	0,91	312,1***		
$\mathbf{H}(+)\mathbf{N}(+)$	N° sem= 0,3859X + 20,58	[17,7; 1244]	0,59	35,41***		
H(+) N(++)	N° sem= 0,8488 $X - 53,39$	[44,3; 1513,5]	0,83	170,1***		
	X = Peso aéreo de la planta madre (g)					
	Fórmula	Rango X	\mathbb{R}^2	F		
$\mathbf{H}(0) \mathbf{N}(0)$	N° sem= 39,79X + 10,88	[0,1029; 10,9296]	0,95	537,5***		
$\mathbf{H}(0) \mathbf{N}(+)$	N° sem= $49,56X - 1,79$	[0,1353; 4,8128]	0,77	72,9***		
H(0) N(++)	N° sem= $102,3X - 21,9$	[0,1094; 6,7449]	0,37	15,72***		
$\mathbf{H}(+) \mathbf{N}(0)$	N° sem= $50.2X + 21.16$	[0,1443; 13,9319]	0,90	252,4***		
$\mathbf{H}(+)\mathbf{N}(+)$	N° sem= $42,92X + 31,9$	[0,2126; 10,5614]	0,54	28,65***		
$\mathbf{H}(+)\mathbf{N}(++)$	N° sem= 84,4X - 22,87	[0,2593; 15,326]	0,83	149***		

4.3.2 Evaluación morfométrica y ecofisiológica de las semillas $(F_1 y F_2)$

En la Tabla III.II del ANEXO II se resumen los resultados sobre los atributos seminales evaluados para los diferentes tratamientos maternos en las dos generaciones. Análisis preliminares expusieron analogía entre las variables área y perímetro (Figura III.III) decidiéndose proseguir las evaluaciones utilizando como variable cuantitativa el perímetro seminal.

Como se observa en la Tabla III.I en 2012 (F₁) las semillas mostraron en promedio menores dimensiones que en 2013 (F₂) en peso, pero no en perímetro, evidenciándose que las semillas de mayores pesos no siempre correspondían a un mayor perímetro. De hecho, cuando se calculó la variación de tamaños según los TMA (Tabla 4.4), en la mayoría de los casos hubo que descartar a las semillas más livianas por tratarse de individuos no viables, lo cual no fue así en las de menor perímetro.

Dadas las interacciones observadas (ANEXO III, Tabla III.I), los posibles efectos de TMA sobre los atributos seminales se analizaron individualmente para cada año y para cada UPM. En ambas filiales y para cada TMA el tamaño seminal respecto a la UPM, ya sea evaluado por el perímetro o por el peso total y del pericarpio, manifestó diferencias altamente significativas presentando menores valores las semillas apicales (Tabla 4.3).

Tabla 4.3 Atributos morfológicos y fisiológicos promedios (±DS) de todas las semillas de *Buglossoides arvensis* evaluadas (n=1536), resultantes de dos generaciones sucesivas: 2012 (F₁) y 2013 (F₂). Las mismas provienen de diferentes tratamientos maternos ambientales (TMA, siendo H(0): baja y H(+): alta disponibilidad hídrica y N(0): 0, N(+): 75 y N(++): 150 kg N ha⁻¹) y de ubicación diferencial en la planta madre (UPM, correspondiendo Ap: apicales y Ba: basales). Las letras comparan el efecto de UPM dentro de cada TMA para las variables de perímetro, peso y emergencia según el test de Tukey.

				Peso		Emergencia
TMA	UPM	IF	Perímetro (mm)	Total (mg)	Pericarpio (%)	Final (%)
F ₁					` ′	
H(0) N(0)	Ap	$0,65\pm0,05$	7,48±0,48a	3,29±0,73a	2,02±0,6a	0,25±0,11a
	Ba	$0,65\pm0,04$	$8,43\pm0,44b$	$5,12\pm0,95b$	$3,03\pm0,43b$	$0,44\pm0,15a$
H(0) N(+)	Ap	$0,66\pm0,04$	$7,4\pm0,58a$	$3,54\pm0,81a$	$1,62\pm0,62a$	$0,3\pm0,23a$
	Ba	$0,66\pm0,04$	$8,4\pm0,42b$	$5,18\pm1,02b$	$2,85\pm0,52b$	$0,49\pm0,3a$
H(0) N(++)	Ap	$0,66\pm0,04$	$7,53\pm0,64a$	$3,41\pm0,95a$	$1,77\pm0,31a$	$0,23\pm0,17a$
	Ba	$0,66\pm0,04$	$8,41\pm0,58b$	$5,32\pm0,96b$	$2,02\pm0,48a$	$0,49\pm0,8b$
H(+) N(0)	Ap	$0,67\pm0,04$	$7,57\pm0,49a$	$3,29\pm0,92a$	$2,12\pm0,52a$	$0,13\pm0,2s$
	Ba	$0,67\pm0,03$	$8,6\pm0,48b$	$5,77\pm1,13b$	$3,59\pm0,49b$	$0,26\pm0,16a$
H(+) N(+)	Ap	$0,67\pm0,05$	$7,36\pm0,57a$	$3,63\pm0,74a$	$2,03\pm0,8a$	$0,23\pm0,09a$
	Ba	$0,67\pm0,05$	8,35±0,56b	$5,70\pm0,97b$	$2,89\pm0,89b$	$0,55\pm0,14b$
H(+) N(++)	Ap	$0,66\pm0,06$	$7,43\pm0,52a$	$3,19\pm0,76a$	$2,5\pm0,54a$	$0,33\pm0,13a$
	Ba	$0,67\pm0,06$	$8,43\pm0,45b$	$5,85\pm1,02b$	$2,45\pm0,33a$	$0,44\pm0,07a$
\mathbf{F}_2						
H(0) N(0)	Ap	$0,68\pm0,06$	7,14±0,46a	3,19±0,7a	1,25±0,45a	0,16±0,07a
	Ba	$0,69\pm0,05$	$8,17\pm0,51b$	$4,75\pm1,2b$	$2,11\pm0,88b$	$0,3\pm0,1a$
$\mathbf{H}(0)\ \mathbf{N}(+)$	Ap	$0,71\pm0,07$	$6,98\pm0,45a$	$3,22\pm1,16a$	1,44±0,6a	$0,03\pm0,06a$
	Ba	$0,69\pm0,11$	$8,25\pm0,62b$	$5,04\pm0,84b$	$2,19\pm0,65a$	$0,1\pm0,09a$
H(0) N(++)	Ap	$0,68\pm0,04$	$7,61\pm0,58a$	$3,9\pm1,19a$	1,87±0,68a	$0,14\pm0,12a$
	Ba	$0,68\pm0,04$	$8,57\pm0,5b$	$5,88\pm1,08b$	$2,89\pm0,92a$	$0,18\pm0,19a$
$\mathbf{H}(+) \mathbf{N}(0)$	Ap	$0,68\pm0,03$	$7,65\pm0,35a$	$3,9\pm0,98a$	$1,98\pm0,51a$	$0,2\pm0,19a$
	Ba	$0,66\pm0,05$	$8,65\pm0,63b$	$5,98\pm1,96b$	$2,97\pm0,72b$	$0,12\pm0,1a$
$\mathbf{H}(+) \mathbf{N}(+)$	Ap	$0,67\pm0,05$	$7,65\pm0,36a$	$3,69\pm0,91a$	$1,7\pm0,41a$	$0,22\pm0,18a$
	Ba	$0,67\pm0,04$	$8,76\pm0,61b$	$6,3\pm1,2b$	$2,92\pm0,65a$	$0,21\pm0,14a$
$\mathbf{H}(+) \mathbf{N}(++)$	Ap	$0,68\pm0,04$	$7,75\pm0,39a$	$3,63\pm0,85a$	1,88±1,23a	$0,18\pm0,09a$
	Ba	$0,67\pm0,04$	8,7±0,75b	6,2±1,46b	3,41±1,08b	0,27±0,06a

El perímetro seminal fue estadísticamente menor para H(0) en F_2 . Diferencias en el peso seminal (Figura 4.10) se evidenciaron ambos años solo para Ba, siendo las provenientes de H(0) más livianas (p=0,001 y p=0,0019 para 2012 y 2013 respectivamente). En el 2013, este atributo también manifestó significancia en cuanto a la fertilización, aumentando el peso al aumentar el nitrógeno adicionado (p=0,001).

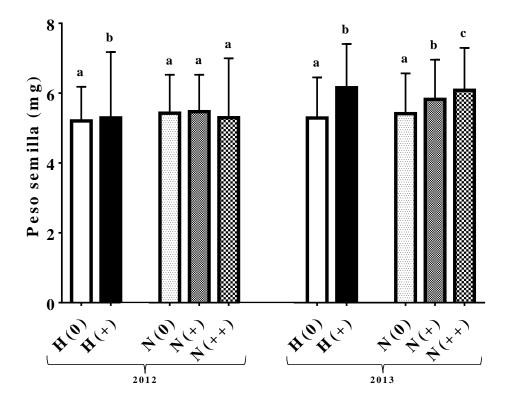


Figura 4.8 Peso medio (\pm ES) seminal de *Buglossoides arvensis* según los tratamientos maternos ambientales de nivel hídrico (H(0): bajo y H(+): alto) y fertilización nitrogenada (N(0): 0, N(+): 75 y N(++): 150 kg N ha⁻¹) para las semillas basales en los dos años de estudio. Letras iguales no manifiestan diferencias estadísticamente significativas según el test de Tukey (α =5%).

El embrión fue en ambos años más liviano en Ap respecto de Ba (p<0,0001). Al aumentar el peso seminal también lo hizo el peso del embrión de manera lineal (Figura 4.9).

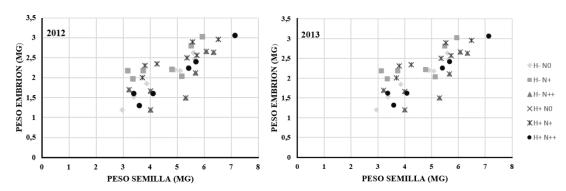


Figura 4.9 Relación lineal entre el peso de la semilla y el peso del embrión de *Buglossoides* arvensis para los diferentes tratamientos maternos ambientales (H(0): baja y H(+): alta disponibilidad hídrica y N(0): 0, N(+): 75 y N(++): 150 kg N ha⁻¹).

La emergencia fue mayor en la primera generación (p<0,0001). La F_1 expresó diferencias respecto a la posición en la planta madre (p=0,0002), emergiendo en mayor proporción las

basales. A su vez, en el tratamiento H(+) emergieron más las que recibieron fertilización nitrogenada respecto a las que no (p=0,0117). El porcentaje de germinación en el 2013 fue muy bajo (18%) sin manifestarse diferencias significativas entre tratamientos. En ningún caso se evidenciaron diferencias respecto a las tasas de emergencia (p>0,05).

La viabilidad no varió entre años (p=0,2793) pero si entre tratamientos maternos tanto para UPM como para TMA. Los porcentajes de viabilidad fueron menores para las semillas apicales (p<0,0001) y a su vez disminuyeron con el aumento de recursos, tanto hídricos (p=0,0003) como nitrogenados (p=0,0384) (Figura 4.9). No hubo ningún tipo de relación entre la cantidad de semillas producidas por planta y la cantidad de semillas no viables (p=0,7125).

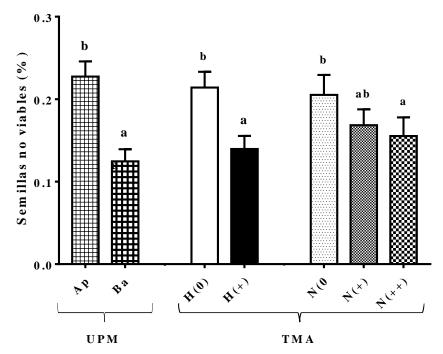


Figura 4.10 Valores re transformados de arco-seno raíz para las medias (\pm ES) de ambos años de las proporciones de semillas no viables según los diferentes tratamientos evaluados: UPM: ubicación en la planta madre (Ap: apical y Ba: basal) y TMA: tratamiento materno ambiental (H(0) y H(+): alta y baja disponibilidad hídrica; N(0), N(+) y N(++): 0, 75 y 150 kg N ha⁻¹ respectivamente). Letras diferentes presentan diferencias estadísticas (α =5%) según el test de Tukey.

4.3.3 Atributos de la plántula

El perímetro del cotiledón (Figura 4.11c) mostró diferencias significativas respecto de UPM en ambos años (p<0,0001). La fertilización nitrogenada influyó en ambos años en el perímetro del cotiledón, aunque en el 2012 no llego a ser significativo estadísticamente (p=0,0751 y p=0,0355). Cuando se utilizó el tamaño de semilla como covariable, la cual fue altamente significativa en ambos años (p=0,0013 y p=0,0035), el efecto debido al TMA pasó a ser no significativo (p=0,2139 y p=0,0637).

El largo del hipocótile se diferenció estadísticamente según UPM en ambos años (p=0,0024 y p=0,0299) siendo más corto en Ap. En el 2012 hubo una tendencia a disminuir dicha longitud al incrementarse la fertilización nitrogenada (p=0,0576) (Figura 4.12). En el 2013, los hipocótiles derivados de H(0) tendieron a ser más cortos (p=0,0709). En este atributo, la covariable tamaño de semilla no fue significativa.

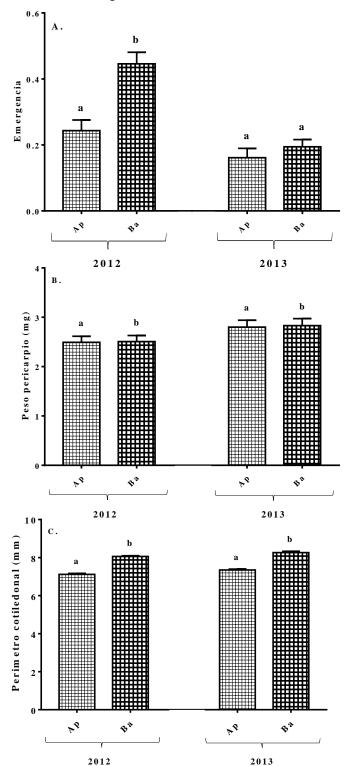


Figura 4.11 Valores medios (±ES) de atributos Buglossoides arvensis según las diferentes posiciones en la planta madre (UPM) (Ap: apicales, Ba: basales) para la F₁ (2012) y la F₂ Porcentaje (2013).B. emergencia Peso del pericarpio (mg). C. Perímetro cotiledonal (mm). Letras diferentes son estadísticamente diferentes según el test de Tukey $(\alpha = 5\%).$

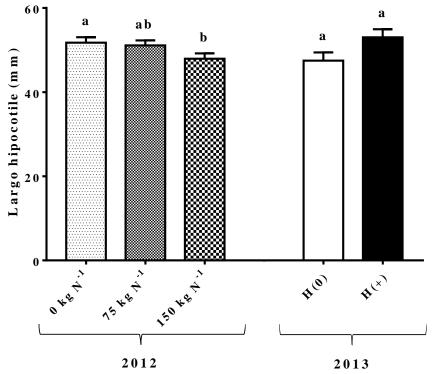


Figura 4.12 Medias (\pm ES) del largo del hipocótile de *Buglossoides arvensis* para los casos donde se encontró significancia estadística (p>0.05) debido a los tratamientos maternos ambientales: En el 2012 según la fertilización nitrogenada (N(0), N(+) y N(++): 0, 75 y 150 kg N ha⁻¹ respectivamente) y en el 2013 según el régimen hídrico (H(0) y H(+): alta y baja disponibilidad hídrica). Letras diferentes son estadísticamente diferentes según el test de Tukey ($\alpha=5\%$).

4. 4 Discusión

4.4.1 Planta madre: plasticidad fenotípica

En el segundo año de ensayo el estand de plantas logradas por UE fue muy superior al del año anterior (p<0,0001) (Tabla III.I), pudiendo haber generado competencia intra-específica. Este hecho explicaría la menor biomasa aérea y producción de semillas. Lang *et al.* (2016) describieron un efecto denso-dependiente en la producción de semillas para esta misma especie, lo cual ha sido reportado también en otras malezas (Mazer & Wolfe, 1992).

La respuesta fenotípica de las plantas madres ante la variación de los recursos disponibles fue muy significativa coincidiendo con lo observado en otras especies (Aarssen & Burton, 1990; Schmid & Dolt, 1994). La fertilización nitrogenada incrementó la biomasa en la F₁ tal como lo describe Bischoff (1999) en situaciones de competencia con el cultivo de trigo. El efecto hídrico se evidenció de manera más pronunciada tanto en la biomasa aérea como en la producción seminal, siendo menor en H(0). Como ya ha sido descripto para otras especies (Galloway, 1995; Wright *et al.*, 1999), bajo condiciones hídricas restrictivas las plantas presentan un ciclo de vida

más corto (crecimiento indeterminado, obs. pers.), lo cual acentuaría la disminución de producción seminal bajo condiciones de estrés hídricos en zonas semiáridas.

El mínimo número de semillas producidas por planta es mayor ante el aumento de recursos. Cuando la especie se encuentra en ambientes pobres de nutrientes, posiblemente un tamaño adulto pequeño no podría sostener el mantenimiento del desarrollo seminal y terminaría abortando. Sin embargo, Galloway (1995) propone que un aumento en el transporte a los tallos vegetativos en condiciones pobres de recursos podría decrecer el *fitness* y, contrariamente, en condiciones de alta disponibilidad lo favorecería. Si esta adaptación fenotípica tiene valor adaptativo, es de esperar que la descendencia manifieste estas variaciones en el tamaño de la planta resultante. Es decir que las plantas provenientes de lugares ricos en recursos presenten un mayor desarrollo de estructuras vegetativas que las provenientes de lugares pobres. Los resultados obtenidos en este capítulo muestran que las plantas madres de la F₂ manifiestan un incremento en biomasa aérea debido a la fertilización nitrogenada. Si bien se encuentran en el mismo ambiente nitrogenado que sus progenitoras, podría inferirse un efecto asociado a la presión de la fertilización sobre la F₂. Esto es válido dado que la respuesta a la selección es típicamente mayor cuando los individuos crecen en el mismo ambiente en el cual la selección es conducida (Galloway, 1995).

4.4.2 Atributos seminales

La mayor producción de semillas registrada en la F₁ sugeriría que este atributo es denso dependiente, dado el menor estand logrado en dicho año. A sí mismo, tanto el número como el tamaño (exclusivamente en las basales) fueron afectados al variar el nivel de recursos, coincidiendo con lo observado en otras especies (Luzuriaga et al., 2006; Vaughton & Ramsey, 1998). En todos los casos, las semillas basales presentaron mayores dimensiones tanto en perímetro (p<0.0001) como en peso (p<0.0001) que las apicales. Estas variaciones pueden deberse a los diferentes momentos de formación durante la estación de crecimiento. Otras especies de crecimiento indeterminado manifiestan una reducción en el tamaño seminal a medida que avanza el ciclo productivo (Hendrix, 1984). En Buglossoides arvensis la floración acrópeta da lugar a semillas basípetas que maduran antes, poseen un mayor tiempo de llenado llegando así a adquirir mayores tamaños en comparación con las apicales. Es debido considerar que los recursos para abastecer las semillas son limitados y la planta no puede aprovisionar a todas las semillas al óptimo nivel (Vaughton & Ramsey, 1998). De todas maneras, surge la inquietud de si las semillas apicales resultaron más pequeñas por menor cantidad de recursos disponibles o debido a que las condiciones ambientales imperantes finalizaron el ciclo ontogénico de la planta antes de que puedan llegar a su tamaño óptimo. Halpern (2005) propone que las variaciones en los tamaños seminales pueden ser el resultado de la falta de control parental hacia este atributo. Esta situación puede presentarse cuando la planta debe enfrentarse a estreses ambientales o bien estar dada por su propia arquitectura, genéticamente determinada, que le limitan el llenado

igualitario de sus semillas. Además, pudieron haber sido las condiciones vivenciadas por las mismas semillas, aquí no estudiadas, las generadoras de las variaciones en el tamaño. Semillas de *L. rigidum* que se desarrollaron a mayores temperaturas presentaron pesos más livianos (Steadman *et al.*, 2004) y en *D. paniculatum* se evidenció una variación en el tamaño seminal debido a los cambios ambientales en la temperatura, disponibilidad hídrica y en el fotoperiodo dada la diferente estacionalidad de la floración y la subsiguiente formación de los frutos (Wulff, 1986a).

Asumiendo que el tamaño de las semillas es influenciado tanto directa como indirectamente por la disponibilidad de recursos, es de esperar una reducción en el tamaño en condiciones de baja disponibilidad hídrica y nutritiva dado que ambos factores afectan la tasa fotosintética (Wulff, 1986a). A su vez, las plantas con buen estatus hídrico siguieron elongando sus tallos por más tiempo dando lugar a más flores y frutos, los cuales disminuyeron progresivamente de tamaño y por ende aumentando la variación en tamaño de la población. Esta podría ser la causa por la cual las semillas apicales de los tratamientos H(0) presentaron mayores tamaños que las de H(+). La variación en el tamaño de semillas dentro de una población puede ser resultado de una evolución adaptativa si beneficia al *fitness* de los progenitores (Halpern, 2005). Al frenarse la producción de semillas bajo limitantes hídricas, no se generaron semillas muy chicas, las que darían lugar a individuos de menor tamaño e incompetentes ante un escenario ambiental similar (Ver sección 4.4.4).

4.4.3 Emergencia

Los porcentajes de emergencia a los seis meses de producidas las semillas fueron llamativamente bajos, especialmente en el 2013 en donde no se llegó a evidenciar ningún tipo de diferencia debido a algún tratamiento materno. En el 2012, las semillas basales de mayor tamaño respecto a las apicales germinaron más, coincidiendo con numerosa bibliografía (Schaal, 1980; Stanton, 1984; Weller, 1985; Wulff, 1986b; Hendrix & Trapp, 1992; Halpern, 2005). A su vez, las semillas de madres fertilizadas emergieron más que las provenientes de N(0), solo en los tratamientos de alta disponibilidad hídrica. Este patrón coincide con los resultados de germinación registrados a lo largo de la tesis, además de la abundante bibliografía citada. El nivel hídrico en H(0) pudo haber sido insuficiente para la asimilación nitrogenada necesaria para manifestar efectos sobre la emergencia.

La menor emergencia de las semillas apicales podría deberse al menor tamaño seminal y/o a las diferentes condiciones ambientales, como temperatura y fotoperiodo, a las que fueron expuestas durante su formación (Honěk & Martinková, 2002). El fotoperiodo, durante la maduración seminal, es un indicador confiable de la estacionalidad influyendo en los niveles de dormición y por ende en la proporción de progenie que germina y emerge en otoño o en primavera y el remanente en el banco de semillas (Munir *et al.*, 2001). Hay numerosos ejemplos del efecto

de la maduración diferencial en la planta madre sobre la germinabilidad, resultando en variaciones en tiempo o espacio (Karimmojeni *et al.*, 2014; Pizzorno *et al.*, 2012; Ceccato *et al.*, 2011; Honěk & Martinková, 2002; Munir *et al.*, 2001; Lacey *et al.*, 1997) como casos donde no se halló influencia alguna (Pizzorno *et al.*, 2012; Howe & Richter, 1982).

Buglossoides arvense, al momento de germinar, se encuentra con un impedimento físico impuesto por las cubiertas seminales. En los ensayos aquí expuestos se notifica que al disminuir el peso seminal se reduce tanto el peso del pericarpio como el porcentaje de germinación. De haber una influencia en la acumulación de tejidos periféricos habría que analizar que sucede en la zona micropilar. Dado que es únicamente esta zona la perforada por la radícula para poder germinar, aunque el pericarpio se espese y aumente mucho en peso, si esta zona no se ve afectada, el incremento en peso no va a afectar de esta manera la germinación. Otra posible razón por la cual las basales emergieron antes, sugiriendo un menor nivel de dormición, puede deberse a que al madurar antes van experimentando un after-ripening en la planta madre (Longás et al., 2016).

Si semillas con distintos tamaños poseen diferentes requerimientos fisiológicos para salir de la dormición, la especie puede aprovechar estratégicamente los diferentes escenarios que se dan en un ambiente impredecible, germinando en diferentes momentos según le sea conveniente a cada individuo en particular (Khan & Ungar, 1984; Gardarin & Colbach, 2015). Estas consecuencias en el establecimiento de la plántula, hacen que el tamaño seminal influya en la habilidad de una especie de persistir en un hábitat particular. Por lo tanto, el ambiente impondría una selección sobre el tamaño de las semillas según los distintos ambientes (Winn, 1988).

La germinación en otoño puede ser una selección ventajosa cuando el riesgo de mortandad durante el invierno es bajo, permitiendo a la planta florecer antes en primavera o con un mayor tamaño. Por el contrario, será provechoso posponer la germinación hasta la primavera si el riesgo de mortandad en el invierno es alto (Munir *et al.*, 2001). De aquí puede surgir la hipótesis de que las semillas grandes darán plántulas de mayor tamaño que toleraran los fríos invernales, pero no así las pequeñas, por lo que su emergencia se pospone hasta la primavera. Sin embargo, habría que evaluar que tan competentes son las plántulas más pequeñas resultantes en este período de mayor estrés.

4.4.4 Atributos de la plántula

Como lo indica la bibliografía para numerosas especies (Schmid & Dolt ,1994; Howe & Richter, 1982; Weller, 1985; Hendrix *et al.*, 1991; Staton, 1984; Choe *et al.*, 1988; Halpern, 2005; Hendrix *et al.*, 1991; Vaughton & Ramsey, 1998; Wulff, 1986b), el tamaño de la plántula se relaciona con el tamaño seminal para *B. arvensis*. El perímetro cotiledonal respondió al tratamiento nitrogenado, pero estas tendencias se desvanecieron al aplicar al tamaño seminal como covariable, indicando la relación directa que hay con este atributo. En cambio, las

tendencias mostradas en el hipocótile respecto a TMA o a la UPM no fueron afectadas por el peso seminal.

El peso del embrión aumentó linealmente con el peso seminal y esto justifica el mayor tamaño de las plántulas originales de las semillas basales. Este resultado sugeriría que la reserva en semillas más grandes es mayor conteniendo mayores cantidades de nutrientes. De esta manera, generar semillas de mayor tamaño implicaría un mayor costo, especialmente cuando las condiciones ambientales nutritivas son limitadas (Vaughton & Ramsey, 1998).

Al poseer mayores reservas, las semillas de mayor tamaño podrán emerger de mayores profundidades. En *Lithospermum caroliniense*, cuyo fruto uniseminado es similar al de *B. arvensis*, se obtuvieron los mismos resultados. Dado que no queda endosperma cuando la semilla alcanza la madurez, Weller (1985) sugiere que el tamaño seminal es un buen indicador de la capacidad de elongación del hipocótile.

Desde el punto de vista ecológico y considerando que la semilla contiene un embrión y reservas energéticas, las diferencias entre altas y bajas reservas puede explicar las disimilitudes entre una planta vigorosa y una débil influyendo en su establecimiento (Howe & Richter, 1982; Wulff, 1986a). El tamaño de la plántula está correlacionado también con su supervivencia. En general, plántulas de menor tamaño tienen más chances de morir que sus hermanas de mayores dimensiones. Sin embargo, este hecho va a depender del ambiente y el momento en que las mismas emerjan (Wulff, 1986b).

CAPÍTULO V

Efecto de la intensidad lumínica sobre las características morfo-fisiológicas de la descendencia en semilla y plántula

5.1 Introducción

Al momento de evaluar el crecimiento y desarrollo vegetal bajo diferentes circunstancias hay que considerar tres componentes (Huber *et al.*, 1999). El primero es la estructura básica de una planta o "proyecto de arquitectura (*architectural blue print*)", atributo fijado filogenéticamente que define los límites dentro de los cuales una especie puede responder bajo diferentes factores bióticos y abióticos del ambiente. El segundo componente, la ontogenia, es la suma de los estados de desarrollo y representa el componente dinámico del proyecto de arquitectura. Por último, el componente que afecta la forma de una planta es el ambiente, siendo los cambios que produce conocidos como plasticidad fenotípica (Huber *et al.*, 1999).

Frente a condiciones de sombreado, las especies vegetales pueden exhibir dos tipos de respuesta: tolerancia o evasión (Smith & Whitelam, 1997). En las malezas, las respuestas relacionadas a evitar el sombreado hacen a las estrategias competitivas influyendo en su ciclo de vida y demográfica poblaciónal. La plasticidad fenotípica en respuesta a las diferentes intensidades lumínicas se manifiesta desde el nivel sub-celular, a nivel de órgano hasta un nivel superior afectando la arquitectura de la planta (Balaguer *et al.*, 2001), tanto en procesos fisiológicos como en características morfológicas (Smith & Whitelam, 1997). El fin de estas respuestas se centra en conferir ventajas selectivas en diferentes hábitats ecológicos (Franklin, 2008) y de esta manera incrementar el *fitness* del individuo al lograr capturar una mayor cantidad de recurso lumínico ante una condición de limitación (Brainard *et al.*, 2005).

Dentro de los ejemplos de plasticidad fenotípica más comúnmente observados se pueden mencionar la partición diferencial de recursos entre las estructuras aéreas y subterráneas. Por lo general, plantas crecidas bajo sombra en comparación con luz plena transportan una proporción mayor de sus recursos a las partes aéreas (hojas y/o tallo) en detrimento de la subterránea (Coleman *et al.*, 1994). Como ejemplo, plantas de *Quercus coccifera* aumentaron el transporte a los tallos en detrimento de las raíces ante una reducción del 80% de la intensidad lumínica (Balaguer *et al.*, 2001).

Ante una menor disponibilidad lumínica, la mayoría de las especies testeadas en la bibliografía expresaron una reducción de la materia seca, ya sea de toda la parte aérea y/o subterránea o de algunos órganos en particular. Por ejemplo, en *Abutilon theophrasti* el peso seco decrece linealmente con el incremento en sombreado (Bello *et al.*, 1995). Plántulas de *Impatiens capensis* redujeron cinco veces el peso seco ante una reducción de la intensidad lumínica del 94% (Schmitt & Wulff, 1993). Plantas de *Polygonum lapathifolium* creciendo con un 20% de luz expresaron menor biomasa total que sus pares desarrolladas en plena luz (Sultan, 2000). De similar manera, tanto las rosetas como las plantas adultas de *Campanulastrum americanum* presentaron una disminución de hasta cuatro veces su tamaño en comparación a plantas crecidas en plena luz solar (Galloway & Etterson, 2009).

En las plantas herbáceas, el sombreado puede alterar la arquitectura de la planta afectando la iniciación y el destino de los fotoasimilados, el tamaño y la estructura de los órganos. Ante una abrupta reducción de la intensidad lumínica al 4,3% se redujo la ramificación lateral en *Potentilla reptans* y *Glechoma hederacea*. En el primer ejemplo fue debido a una reducción plástica en el número de meristemas disponibles para la producción de ramificaciones y en el segundo en la proporción de meristemas por nudo que se diferenciaron en ramas (Huber *et al.*, 1999).

La disminución de la ramificación es una respuesta común en individuos desarrollados bajo competencia, respuesta generalmente acompañada por un incremento en la altura (Schmitt & Wulff, 1993). La elongación de los entrenudos es una respuesta común al sombreado en *Arabidopsis* sp. (Morelli & Ruberti, 2000), cuyo objetivo se basaría en elevar las hojas entre la canopia superando la vegetación circundante que la sombrea. De esta manera se incrementaría la intercepción de luz con un aumento del *fitness* (Franklin, 2008; Weinig, 2000a). Una situación análoga se ha observado en *A. theophrasti* (Weinig, 2000b) con el aumento del largo de los hipocótiles cuando las plántulas emergen con limitantes lumínicas o en los pecíolos de *Trifolium repens* ante el sombreado (Weijschedé *et al.*, 2006). En *Arabidopsis* sp., una planta típicamente "*shade-avoiding*" (que evita el sombreado) se observan ambas respuestas, tanto la elongación de los pecíolos como del hipocótile (Morelli & Ruberti, 2000).

Sin embargo, en otras especies se ha observado la respuesta contraria, disminuyendo la altura junto con la disponibilidad lumínica. Esto último se ha reportado para *A. theophrasti* (Bello *et al.*, 1995) y para *C. americanum* (Galloway & Etterson, 2009). Según Galloway & Etterson (2009) las especies que acostumbran crecer en ambientes de alta y uniforme luminosidad expresan diferentes patrones de plasticidad respecto a las de ambientes más sombríos. La respuesta de elongación para superar al sombreado de los vecinos sería típica del primer tipo de hábitat.

Tanto el número como la morfología de las hojas suele ser un atributo altamente plástico ante variaciones lumínicas. Reducciones en número ante una menor luminosidad se ha citado para *A. theophrasti* (Bello *et al.*, 1995). En *A. powelli* se registró una menor velocidad de brotación por lo que las plantas llegaron a floración con una menor cantidad de hojas (Brainard *et al.*, 2005).

La generación de hojas con una mayor área específica (SLA: specific leaf área, cm² mg⁻¹), es decir más delgadas, pero de mayor área, es un patrón común en ambientes sombríos. Su explicación ecológica estaría basada en la distribución de los recursos disponibles a fin de interceptar la mayor radiación posible. Como ejemplo de este fenómeno se puede citar a *C. americanum* (Galloway & Etterson, 2009), *P. lapathifolium* (Sultan, 2000) y *T. repens* (Weijschedé *et al.*, 2006). Una reducción en la luz disponible generó la respuesta descripta en hojas de *Q. coccifera* cuyo borde, a su vez, fue menos lobulado y la disposición foliar (ángulo respecto al tallo) también se vio afectado (Balaguer *et al.*, 2001).

Ante una reducción de recursos, es de esperar una reducción en el *output* reproductivo como se observó en *C. americanum*, quien redujo su producción de frutos y semillas al

desarrollarse en ambientes sombríos (Galloway & Etterson, 2007). A su vez, al disminuir en un 85% la luz solar incidente plantas de *Polygonum hydropiper*, *P. lapathifolium*, *P persicaria* y *P. cespitosum* disminuyeron su producción de aquenios (Sultan, 2001). *Datura ferox* (Sánchez *et al.*, 1981) también redujo la producción de semillas ante una reducción del 50% de luz incidente.

La luz provee a las plantas información tanto espacial como temporal de su entorno (Franklin, 2008). Las plantas reaccionan a esta información plásticamente. Esta plasticidad puede ocurrir trans-generacionalmente si influyen en la expresión de caracteres de la progenie (Galloway & Etterson, 2009). De esta manera, a través del ajuste fenológico de la descendencia, por el efecto materno, esta información es transmitida a la siguiente generación con el objetivo de aumentar el *fitness* (Galloway, 2005). Abundantes estudios confirman que el ambiente lumínico maternal impacta sobre diferentes características morfológicas y fisiológicas de la progenie principalmente durante los estadios juveniles. Este hecho no es llamativo dado que las semillas se desarrollan en la planta madre vivenciando directamente el ambiente materno. Además, especialmente las anuales, inician su desarrollo muy próximo en tiempo a la generación maternal (Galloway & Etterson, 2009).

Por lo tanto, las plantas pueden responder a las condiciones ambientales ajustando tanto su fenotipo como el de su progenie mediante cambios en la cantidad y calidad del aprovisionamiento seminal y la estructura o bioquímica de las cubiertas seminales y tejidos del fruto (Sultan, 2000). Los ejemplos encontrados en la bibliografía para estos atributos arrojaron resultados variados. Cuando a *P. persicaria* se le redujo la luz solar al 8%, las plantas produjeron semillas más livianas debido a que presentaban un pericarpio más delgado (Sultan, 1996). De manera similar, *P. hydropiper*, *P. lapathifolium* y *P. cespitosum* redujeron en un 35, 32, y 19%, respectivamente, el peso de sus aquenios al desarrollarse bajo un 15% de la radiación solar incidente (Sultan, 2001). En *Campanula americana* la respuesta fue similar, bajo un ambiente materno de menor disponibilidad lumínica las semillas resultantes fueron relativamente chicas (Galloway, 2001). Plantas sombreadas de *A. theophrasti* producen menos capsulas con menos semillas en comparación con plantas sin sombrear, aunque dichas semillas fueron más pesadas (Bello *et al.*, 1995). A la vez hay casos, como en *A. powelli* (Brainard *et al.*, 2005) o *D. ferox* (Sánchez *et al.*, 1981), en donde el peso permanece invariable. En *Plantago lanceolata* ni variaciones en la cantidad como en la calidad de la luz alteraron el largo de las semillas (Van Hinsberg, 1998).

Las plantas también suelen responder a la competencia por la luz a través de cambios en el nivel de dormición de sus semillas. El aumento de la dormición en semillas madurando bajo sombra puede ser otra manera adaptativa de evitar el sombreado debido a que la germinación bajo ambientes competitivos podría reducir la probabilidad de la sobrevivencia de la plántula (Brainard *et al.*, 2005). Esta teoría es válida en aquellas especies donde el incremento en disponibilidad lumínica genera descendencia más despierta como es el caso de *P. lanceolata* (Van Hinsberg, 1998) y *A. powellii* (Brainard *et al.*, 2005).

Sin embargo, esta respuesta parece depender de la especie, dado que en la bibliografía se encuentran resultados diversos. Bello *et al.* (1995) describieron una reducción en la germinación de semillas provenientes de madres sombreadas en *A. theophrasti*. Del mismo modo, Pizzorno *et al.* (2012), Sultan (1996) y Sánchez *et al.* (1981) observaron una disminución en el nivel de dormición de *Helianthus annus*, *P. persicaria* y *D. ferox* respectivamente, ante una reducción en la radiación incidente durante la formación de las semillas. Este hecho los autores lo atribuyeron en ambos casos a diferencias en las cubiertas que imponen la dormición. El ambiente lumínico donde se generaron semillas de *C. americana* influyó en la estación donde luego expresaron mayores porcentajes de germinación; siendo en otoño cuando las plantas madres crecieron expuestas a la luz solar y en primavera cuando fueron sombreadas (Galloway, 2005).

El ambiente lumínico de plantas madres influye en la morfología de las plántulas. Muchas veces es una consecuencia indirecta, dado que al influir en el tamaño seminal luego determina el tamaño de la plántula resultante (ver capítulo IV). Sin embargo, hay bibliografía que describe un efecto directo del ambiente maternal sobre la descendencia. En *P. persicaria* no se evidenciaron variaciones en el total de la biomasa de plántulas derivadas de madres crecidas bajo alta o baja intensidad lumínica, pero las raíces de las plántulas de baja intensidad fueron más cortas, sugiriendo un mayor transporte al hipocótile (Sultan, 1996). Plántulas de *A. theophrasti* provenientes de plantas crecidas en campos de maíz generaron hipocótiles más largos que plántulas cuyos progenitores provenían de campos naturales. Dado que esta maleza emerge junto con el maíz, se trataría de una estrategia para evitar su sombreado en los estadios iniciales (Weinig, 2000a).

El principal objetivo del presente trabajo fue estudiar el efecto que diferentes intensidades lumínicas recibidas por las plantas madres tuvo sobre la progenie, medido a través de los cambios en las características morfo-fisiológicas de las semillas y plántulas. Se realizaron estudios complementarios para evaluar también la biomasa aérea de las plantas madres y la posible relación entre dichas variables.

5.2 Materiales y métodos

5.2.1 Origen del material

Semillas de *B. arvensis* fueron recolectadas al momento de su dispersión natural en diciembre dos años consecutivos, 2011 y 2012, en campos de avena (*Avena sativa* L.) de la estación experimental del INTA-Bordenave $(37^{\circ}50'55"S, 63^{\circ}01'20"W)$, Buenos Aires, Argentina. Los propágulos fueron almacenados en bolsas de papel bajo condiciones de laboratorio $(20 \pm 2 \, ^{\circ}C)$ hasta el momento de establecer los ensayos a campo.

5.2.2 Producción de las plantas madres

En agosto de 2012 y luego en julio de 2013, se realizaron las siembras de *B. arvensis* para generar descendencia bajo tres condiciones de intensidad lumínica. Se sembraron 250 semillas (0,150 g) por unidad experimental (1 m²) a una profundidad de 2 cm.

Desde el estado de plántula, las plantas madres se sometieron a diferentes Tratamientos Maternos Ambientales (TMA) consistentes en tres Intensidades Lumínicas Maternales (ILM) (AI: Alta Intensidad (luz solar directa); MI: Media Intensidad (37% sombreado neutral) y BI: Baja Intensidad (76% sombreado neutral). Para lograr este gradiente, las unidades experimentales fueron cubiertas con una estructura de metal envuelta en rompe vientos y media sombra (para lograr los tratamientos de MI y BI respectivamente). En ambos años, la cantidad media de fotones incidentes (PFD) fue de 1068 (AI), 669 (MI) y 255 (BI) μmol m⁻² s⁻¹. Dichas mediciones se realizaron semanalmente entre las 11:00 A.M. y 1:00 P.M., con un radiómetro (BAR-RAD 100, Cavadevices, Argentina). La temperatura del suelo en cada tratamiento fue registrada mediante ibuttons (Thermochron Ibutton, Maxim-Dallas, Int prod) y la humedad con un acuímetro dieléctrico (Decagon Devices, Inc®). Se siguió un modelo completamente aleatorizado con tres réplicas.

Las unidades experimentales se encontraban distanciadas a 1,5 m evitando el sombreado. Se aplicó un riego complementario por goteo para evitar condiciones de extrema sequía. Se efectuó desmalezado manual para evitar la competencia interespecífica.

Figura 5.1 Generación a campo de las plantas madres con distitas condiciones de sombredo siguiendo un DCA.



La primera semana de enero tanto en la campaña 2012-2013 como en 2013-2014, las semillas maduras fueron cosechadas manualmente. Paralelamente, se tomaron aleatoriamente de cada unidad experimental, cinco de las 50 plantas logradas por m² (pseudoréplicas) (PMS: Plantas Madres Seleccionadas) dando un total de 45 (3 TMA * 3 réplicas * 5 pseudoréplicas). Las semillas de cada PS de las diferentes ILM fueron utilizadas para la cuantificación de las correspondientes características (*ver sección semillas*). Se formaron tres pooles de semillas, uno por ILM, con la producción de las plantas remanentes.

5.2.3 Biomasa aérea de las plantas madres (solo 2014)

Al finalizar el segundo año experimental (enero del 2014), se estimó la biomasa aérea de las 45 PMS (correspondientes a los diferentes ILM). Se tomaron los valores del peso seco total (PS) (60 °C por 72 hs), el largo de tallos (L) (suma del tallo principal más las ramificaciones) y se calculó la relación PS/L.

5.2.4 Características de las semillas

Peso

Se estimó el peso de mil semillas (P_{1000}) por cada ILM. Para lo cual se pesaron en una balanza analítica (\pm 0,0001 g) seis muestras de 100 semillas por intensidad lumínica.

Tamaño y forma

De cada PMS se tomaron manualmente al azar cinco semillas (S), se secaron al aire y fueron cuidadosamente identificadas (N = 225 semillas por año). El peso fresco fue estimado con una aproximación del 0,1 mg usando una microbalanza. El contenido de agua a cosecha fue 6% (dwd).

Cada S fue medida con un micrómetro digital registrando el ancho (medido en la sección más ancha de la semilla) y el largo. La forma de la semilla fue evaluada según el IF y el tamaño por la estimación del perímetro como se detalló en el capítulo IV.

5.2.5 Características de las plántulas (solo para 2014)

Emergencia

Las 225 CS (5 S * 45 PS), cosechadas en enero de 2014, fueron utilizadas en un ensayo de emergencia bajo condiciones de laboratorio con el fin de evaluar posibles relaciones entre características fenotípicas de las plántulas y los ambientes lumínicos maternales (i.e. MLI) y/o las características seminales de las semillas provenientes de cada MLI.

El ensayo de emergencia se realizó en cámara de crecimiento a temperatura óptima de 15 °C (Chantre *et al.*, 2009b), bajo oscuridad y siguiendo un diseño experimental completamente aleatorizado. Las semillas fueron sembradas a 1,5 cm de profundidad en plantineras con perlita. Se utilizó agua desmineralizada para mantener húmedo el sustrato.

La emergencia fue monitoreada diariamente durante 30 días bajo luz verde. Dicha luz permitió minimizar la actividad fotosintética cotiledonal. Las plántulas fueron consideradas emergidas cuando los cotiledones alcanzaban la superficie del sustrato.

Al final del ensayo, todas las plántulas no emergidas fueron chequeadas por la presencia de la radícula y fue testeada la viabilidad en las semillas no germinadas. Dichas semillas fueron consideradas viables si soportaban una presión moderada de fórceps (Borza *et al.*, 2007).

La proporción de plántulas emergidas fue calculada sobre el total de semillas viables. El tiempo medio de emergencia se determinó según Milberg *et al.* (1996). Los porcentajes finales de emergencia y sus tasas fueron calculadas para la descendencia de cada tratamiento materno.

Tamaño y forma de las plántulas

El tamaño de las plántulas de *B. arvensis* fue estimado sobre el largo del hipocótile y el largo y ancho (y relación) de los cotiledones, a los cinco días de la emergencia, medidos con un micrómetro de igual manera que en capítulo IV.

Peso del pericarpio y del embrión.

Al finalizar el ensayo de emergencia, el pericarpio (tejido materno) de cada S fue cuidadosamente separado del embrión/cotiledón y secado a estufa (60°C) durante 48 horas. El peso seco del pericarpio fue pesado con una aproximación del 0,1 mg. El peso del embrión fue estimado sustrayéndole el peso del pericarpio al peso inicial de cada semilla (ver sección 4.2.8).

5.2.6 Análisis estadísticos

Biomasa aérea de las plantas madres y producción de semillas

Los datos de A, L y A/L se testearon con análisis de varianza (ANAVA) anidado seguido por test de Tukey's (p<0,05). La producción de semillas en ambos años (2013 y 2014) fue comparada utilizando ANAVA doble seguida por Tukey's test (p<0,05). Para cumplir con el supuesto de homocedasticidad, todas las variables sufrieron transformación logarítmica.

Características de las semillas descendientes

El peso de mil fue analizado mediante ANAVA doble para poder observar el efecto del año de producción (YP) (2013 y 2014) y los tratamientos maternos (ILM). La transformación de los datos no mejoró la homocedasaticidad por lo que los ANAVA se realizaron con la información sin transformar. Luego se corrieron test de Tukey's (p<0,05).

El análisis de la varianza anidado se llevó a cabo con los datos de la forma seminal obtenidos de un total de 90 plantas (3 ILM * 3 réplicas * 5 pseudoréplicas * 2 años) testeando la contribución relativa entre y dentro (entre repeticiones y entre plantas en cada unidad experimental) los tratamientos maternos. Todas las variables fueron transformadas con logaritmo antes de realizar los análisis. Posibles diferencias entre ILM y AP sobre las características de las semillas fueron testeadas con ANAVA doble seguido por test de Tukey. Las interacciones significativas fueron re analizadas con ANAVA simple sobre cada efecto principal (año). Se realizaron análisis de covarianza utilizando el número de semillas producido por planta como covariante.

Características de las plántulas

Las tasas y porcentajes finales de emergencia se analizaron con ANAVA seguido por test de Tukey. Como la transformación de los datos no mejoró la homocedasticidad, los datos se evaluaron sin transformar. Se utilizaron análisis de regresión para detectar posibles relaciones entre el tamaño o el peso de la semilla, la tasa y la emergencia acumulada (Milberg *et al.*, 1996).

Las variables de tamaño y forma de las plántulas (i.e. largo de hipocótile, ancho cotiledonal, largo y su radio) tanto como el peso del pericarpio y el embrión se analizaron con ANAVA y test de Tukey´s. Solo P/L necesitó ser transformado logarítmicamente para cumplir con el supuesto de homocedasticidad. Se realizaron análisis de regresión para examinar relaciones entre características de las plántulas y de las semillas.

5.3 Resultados

5.3.1 Atributos de las plantas madres

En la mayoría de las características analizadas *B. arvensis* expresa plasticidad fenotípica respondiendo al gradiente de luz (i.e. 100, 60 y 20% PFD). La biomasa aérea de las plantas madres se redujo al decrecer la intensidad lumínica incidente. Tanto el peso como el largo de los tallos fue mayor para AI en comparación con MI y BI (Figura 5.2A-B), mientras que la relación PS/L mostró una reducción progresiva (Figura 5.2C). Si bien la arquitectura de las plantas madres generada bajo los diferentes TMA no fue evaluada, las plantas desarrolladas en BI casi no ramificaron difiriendo de AI y MI.

La producción de semillas por planta y el peso de mil fueron mayores en 2013/14 comparado con 2012/13 independientemente del TMA (Figura 5.3-4). No se observó interacción entre ILM * AP (p=0,46). Ambos años la cantidad de semillas producidas en los diferentes ambientes siguió la misma tendencia, produciendo MI una mayor cantidad que BI (p<0,05).

Individualmente para cada ILM, análisis de covarianza utilizando la transformación logarítmica de la relación PS/L aéreo (p=0,0257) como covariable mostró que las plantas de mayor tamaño produjeron más semillas (b=1,12). Paralelamente, el efecto de la intensidad lumínica continuó siendo significativo (p=0,01).

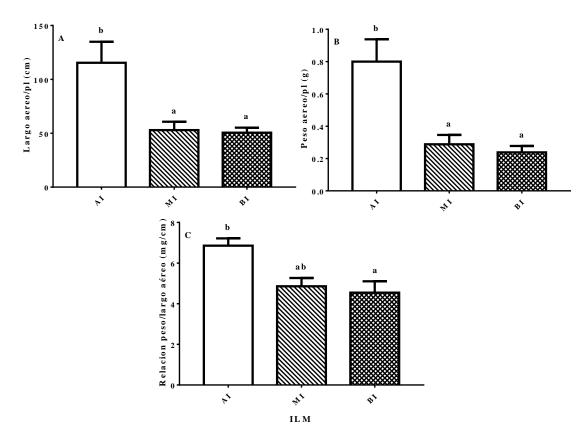


Figura 5.2 Medias re-transformadas (\pm ES) de **A.** largo de tallo, **B.** peso seco aéreo y **C.** relación PS/L por planta para las tres intensidades lumínicas maternales (ILM) siendo AI: alta (PFD: 1068 μ mol m⁻² s⁻¹), MI: media (PFD: 669 μ mol m⁻² s⁻¹) y BI: baja intensidad (PDF: 255 μ mol m⁻² s⁻¹) para la estación de crecimiento 2013-2014.

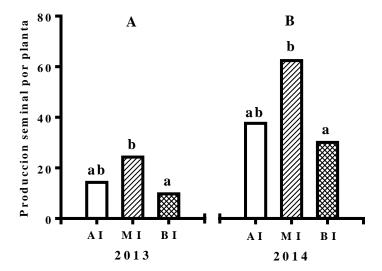


Figura 5.3 Medias re-transformadas de la producción seminal por planta para los tres ambientes lumínicos maternales (ILM): AI (alta intensidad), MI (media intensidad) y BI (baja intensidad) para las estaciones de crecimiento 2012/13 y 2013/14. Barras con la misma letra no son estadísticamente diferentes según el test de Tukey (α =5%). Las letras mayúsculas indican diferencias ente años mientras que las minúsculas entre ILM dentro de cada año.

5.3.2 Características de las semillas

Una interacción de primer orden fue observada entre ILM * AP para la variable de peso de mil semillas (Figura 5.4), por lo que se realizaron ANAVAS independientes para cada AP. En ambos años, 2012/13 (p=0,0004) y 2013/14 (p=0,0002), diferencias significativas en el peso de mil fueron observadas entre ILM. El peso seminal tendió a incrementarse con el régimen lumínico (Figura 5.4), siendo notorias las diferencias entre AI y BI en ambos años (p<0,05). Cuando se analizó el peso individual de las SC los resultados fueron similares: un mayor peso en el segundo año (p<0,0001) y la tendencia de incrementar el peso al aumentar el régimen lumínico, aunque este resultado no fue estadísticamente significativo (p=0,2163).

Como se observa en la Tabla 5.1, las variables morfométricas de las semillas no mostraron interacción entre ILM y el AP. Las variables medidas no fueron afectadas por ILM. Sin embargo, el ancho, largo y perímetro seminal expresaron diferencias altamente significativas entre años. El IF permaneció invariable debido al ILM o AP (p>0,05). Los análisis de ANCOVA revelaron que la producción media de semillas por planta no causó influencia alguna sobre los atributos seminales evaluados (p>0,05).

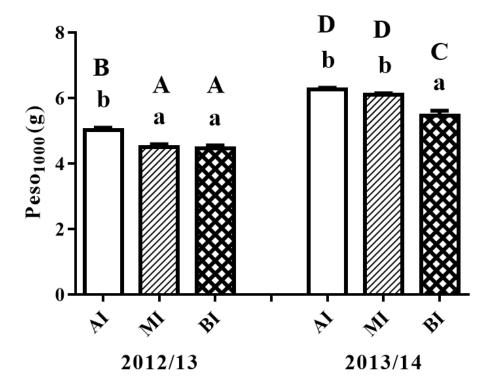


Figura 5.4 Peso medio (\pm ES) de mil semillas (P_{1000}) en gramos, para cada régimen de intensidad lumínica maternal (ILM): AI (alta intensidad), MI (media intensidad) y BI (baja intensidad) para las semillas de *Buglossoides arvensis* cosechadas en enero del 2013 y 2014. Barras con la misma letra no son estadísticamente diferentes según el test de Tukey (α =5%). Las letras mayúsculas indican diferencias ente años mientras que las minúsculas entre ILM dentro de cada año.

Tabla 5.1 Valores F para las variables de forma de las semillas SC de *Buglossoides arvensis* provenientes de diferentes regímenes de intensidad lumínica (ILM) y años de producción (AP). Las variables fueron transformadas con logaritmo en base 10 previo al análisis estadístico de ANAVA.

Atributo seminal	ILM * AP	ILM	AP
Largo (W)	1,13 ^{ns}	1,39 ^{ns}	35,40**
Ancho (L)	1,37 ^{ns}	1,72 ^{ns}	34,12**
IF	1,7 ^{ns}	1,28 ^{ns}	7,76**
Perímetro	$0,9^{ns}$	1,98 ^{ns}	32,11**
Peso	1,81 ^{ns}	1,88 ^{ns}	19,19***

5.3.3 Patrones de Emergencia

Los porcentajes finales de emergencia difirieron significativamente según el TMA (p=0,02) siendo mayor para las descendientes de madres sombreadas en comparación a las plantas expuestas a plena luz solar (Figura 5.5A). Los requerimientos de tiempo térmico para la emergencia no han podido ser calculados debido a que las semillas derivadas de AI emergieron en un porcentaje demasiado bajo.

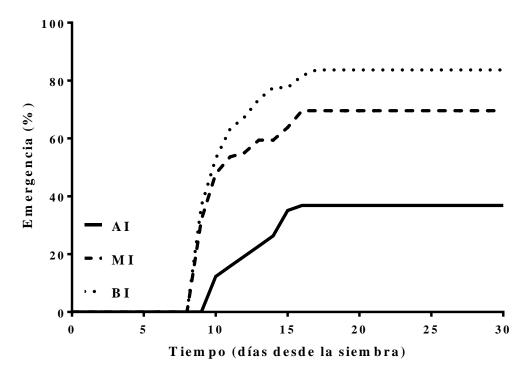


Figura 5.5 Porcentajes acumulados de emergencia de plántulas de *Buglossoides arvensis* durante un período de incubación de 30 días. Las semillas fueron obtenidas de plantas madres sujetas a diferentes intensidades lumínicas (ILM siendo AI: alta, MI: media y BI: baja intensidad).

La viabilidad entre TMA mostró diferencias estadísticas (p=0,0012). Las semillas originadas de la intensidad lumínica media presentaron los mayores porcentajes, siendo las de la alta intensidad las que presentaron los menores (Figura 5.6).

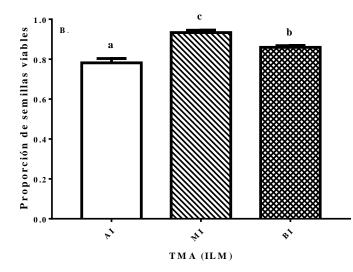


Figura 5.6 Efectos del ambiente lumínico durante el desarrollo seminal sobre los porcentajes de viabilidad de las semillas (media \pm ES). Diferentes letras indican diferencias estadísticamente significativas según el test de Tukey (p<0,05).

No se observaron diferencias estadísticamente significativas en el peso del pericarpio entre ILM. El pericarpio proporcionó la mayor proporción del peso total de la semilla variando entre ILM (p<0,05): 63, 60 y 56% para AI, MI y BI respectivamente.

5.3.4 Características de las plántulas

La forma del cotiledón (relación A/L) no manifestó variaciones consistentes respecto del MLI (p=0,105) pero si fue afectado el ancho (p=0,04), el largo (p=0,01) y el perímetro resultante (p=0,01) siguiendo siempre la misma tendencia: AI \geq BI \geq MI (Figura 5.7A). El largo del hipocótile también mostró diferencias estadísticamente significativas (p=0,0038) respecto de ILM (Figura 5.7B). No se encontraron correlaciones entre el porcentaje o tasa de emergencia y el perímetro seminal, peso seminal, peso del pericarpio o peso del embrión.

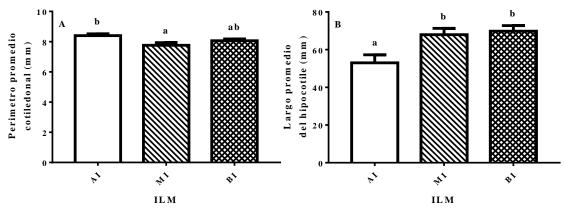


Figura 5.7 Datos re transformados de las medias (±ES) de las plántulas descendientes de semillas generadas bajo diferentes regímenes de intensidad lumínica (ILM siendo AI: alta, MI: media y BI: baja intensidad) correspondientes a **A.** perímetro cotiledonal y **B.** largo del hipocótile por planta.

5.4 Discusión

Queda expuesto, en base a los resultados obtenidos, que diferentes regímenes de intensidad lumínica durante el crecimiento y desarrollo de *B. arvensis* inciden en características morfométricas de las plantas, sus semillas y las plántulas que se originan a partir de ellas.

En las plantas desarrolladas bajo la menor intensidad lumínica la biomasa aérea fue menor y no se observaron casi ramificaciones coincidiendo este resultado con lo observado en *A. theophrasti* (Bello *et al.*, 1995) y *P. lapathifolium* (Sultan, 2000). Esta menor biomasa aérea registrada en los tratamientos de menor intensidad lumínica puede deberse tanto a un efecto del sombreado sobre la tasa del desarrollo ontogénico, como a una menor tasa de crecimiento (Coleman *et al.*, 1994; Galloway & Etterson, 2009), como a una supresión plástica o retraso de la ramificación, fenómeno observado en varias especies ante diversas condiciones ambientales (Huber *et al.*, 1999).

Las condiciones ambientales (i.e. temperatura media del aire y la precipitación) fueron muy similares entre años (información no mostrada). Por lo tanto, se infiere que las diferencias entre años, en cuanto a la producción de semillas, pueden atribuirse a una siembra más temprana y por ende a una emergencia más temprana durante 2013. Como consecuencia, las plantas desarrollaron una fase vegetativa más larga dando lugar a una mayor biomasa y producción de semillas. En ambos años, la producción de semillas por planta fue más alta para el régimen de MI (Figura 5.3). Sin embargo, para el año en que se analizó la biomasa de las madres, tanto el largo como el peso medio aéreo por planta fue significativamente menor en MI comparado con AI (Figura 5.2A-B). Basándose en estos resultados, se puede inferir diferencias en la asignación de recursos bajo los regímenes de intensidad lumínica evaluados.

Para *B. arvensis*, el aumento en la producción de semillas por planta puede ser considerado una estrategia de adaptación a sitios semi-sombreados bajo condiciones de ambientes semiáridos asegurando, de esta manera, una reposición de semillas en el banco para la siguiente temporada. La longevidad de las semillas de *B. arvensis* en el suelo es relativamente corta (1 a 3 años) (Chantre *et al.*, 2009a), por lo que una continua reposición genera un banco persistente de corta duración (*sensu* Bakker *et al.*, 1996).

Por otro lado, Galloway & Etterson (2007) expresan que la plasticidad trans-generacional en *C. americanum*, es adaptativa cuando la progenie crece en el mismo ambiente lumínico que sus progenitores. El material original con que se generaron cada año las plantas madres, fue obtenido bajo condiciones de competencia interespecífica con avena. La mayor producción de semillas observada cada año en el tratamiento MI podría tratarse de un efecto materno adaptativo, si es que la limitación en la cantidad de luz que le generaba la avena fue similar a la de MI.

El peso de mil semillas mostró una tendencia similar en 2012 y 2013 (Figura 5.4) con valores de pesos mayores en 2013, probablemente debido a la fase vegetativa más larga con un mayor suministro de recursos durante la formación, como se mencionó en la sección 5.3.1.

A pesar de las diferencias entre años, la variable "peso de mil" fue menor en el régimen BI comparada con el control AI (Figura 5.4). Similares respuestas se observaron para *P. persicaria* (Sultan, 1996) y *C. americana* (Galloway, 2001). Por el contrario, *A. theophrasti* (Bello *et al.*, 1995) mostró una relación negativa entre el peso de las semillas y el nivel de luz materno. El perímetro no mostró diferencias estadísticas respecto al TMA indicando que el peso es un mejor indicador de la calidad seminal.

Es interesante notar que las plantas generadas bajo MI produjeron muchas más semillas que las desarrolladas en otras intensidades lumínicas. El peso de las semillas no siguió ese comportamiento, sino que decreció con el sombreado sin manifestar diferencias en el perímetro debido al TMA. Además, no se evidenció el típico *trade-off* entre cantidad y tamaño seminal, observado en el capítulo anterior para otros factores ambientales (Leishman, 2001), resultado que concuerda con el reportado por Galloway (2005). Esto último puede deberse a la plasticidad en el suministro de recursos, como se mencionó arriba.

Las dimensiones seminales no fueron influenciadas por ILM pero si por AP (Tabla 5.1) siendo ambas dimensiones (L y A) mayores en las semillas producidas en el 2013 en comparación al 2012. Este resultado concuerda con el mayor peso obtenido en 2013. Independientemente del año, el IF permaneció invariable manifestando este carácter su nula plasticidad. El pericarpio no varió consistentemente con los regímenes de TMA, contrariamente a los resultados expuestos por Sultan (1996) quien trabajo con *P. persicaria*.

Como se observa en la figura 5.5, tanto el porcentaje final de emergencia como la tasa de emergencia fue claramente influenciadas por las diferentes intensidades lumínicas. Se obtuvieron los valores de 84, 69 y 37% para BI, MI y AI respectivamente. Además, como se observa en la Figura 5.6C, que el largo del hipocótile de las plántulas resultantes de los tratamientos con restricciones lumínicas fuero 1,3 veces mayor que el testigo AI.

Considerando que *B. arvensis* presenta dormición fisiológica primaria (Chantre *et al.*, 2009a), el balance hormonal entre el ácido giberélico y el abscísico es la fuerza principal que define la salida de la dormición y la germinación (Ni and Bradford, 1993). Franklin (2008) menciona el efecto estimulador en el crecimiento por parte de GAs, en plántulas sombreadas como requisito, pero no el único, para el crecimiento del hipocótile. Aparentemente, el sombreado podría contribuir a la degradación de DELLA, una familia de proteínas represoras del crecimiento, mediadoras en el camino de la señalización de GAs, permitiéndole a las hormonas superar esta restricción. Por lo tanto, se podrían visualizar dos efectos principales de las giberelinas (i) un efecto favorable en el crecimiento del hipocótile y (ii) un efecto promotor en la superación de la dormición primaria. Se hipotetiza así que como resultado de la reducción del régimen de luz en

la planta madre podría incrementarse el nivel de GAs de origen materno, favoreciendo la superación de la dormición y una emergencia más veloz. De hecho, al finalizar el ensayo de emergencia, el 96% de las semillas sembradas eran viables. Este resultado es consistente con el comportamiento de otras especies (Bello *et al.*, 1995; Pizzorno *et al.*, 2012; Sultan, 1996 y Sánchez *et al.*, 1981) pero difiere del de otras (Brainard *et al.*, 2005; Van Hinsberg, 1998) confirmando la existencia de otros mecanismos de señalización involucrados en las respuestas al evitar el sombreado (Franklin, 2008).

Bajo condiciones de sombreado, y desde una perspectiva ecológica, una emergencia más temprana sumada a un hipocótile más largo, podría claramente favorecer el establecimiento rápido de la plántula, con una mayor probabilidad de capturar recursos naturales limitantes bajo competencia inter-específica. De esta manera, se prolonga el tiempo disponible para la acumulación de biomasa y la posibilidad de ganar en altura a los vecinos con el fin de tomar ventaja en la captura de luz, con el resultado final de incrementar el *fitness* (Franklin, 2008; Weinig, 2000a). Evitar el sombreado es una de las estrategias competitivas más importantes que poseen las plantas durante todo el ciclo de vida, manifestándose desde la germinación hasta la floración (Smith & Whitelam, 1997).

Si las condiciones ambientales son predecibles entre generaciones, los efectos maternos ambientales representan un mecanismo por el cual la planta puede ajustar el fenotipo de su progenie para aumentar su éxito adaptativo en el ambiente en el que probablemente se encuentre (Galloway, 2005). Si bien, la región semiárida bonaerense se caracteriza por ser climáticamente impredecible, el sombreado vivenciado por las plantas de *B. arvensis* que crecen junto a un cultivo, será de seguro muy similar al que experimentarán sus descendientes en la próxima campaña, si es que se repite el cultivo.

La caracterización de la respuesta de las malezas al sombreado es crítica para mejorar el entendimiento de la competencia, la interacción cultivo-maleza y la dinámica poblacional de la maleza (Brainard *et al.*, 2005). Los resultados de este capítulo pueden ser útiles para la elaboración de futuros modelos predictivos de la emergencia de *B. arvensis* en relación al ambiente maternal, interactuando con el cultivo. Por ejemplo, Gardarin *et al.* (2012), diseñaron un modelo multi-especie de emergencia correlacionando la dormición con el peso seminal. De manera similar, diferentes relaciones entre características de las semillas y las plántulas pueden ser desarrollados en futuros estudios.

Los efectos de la calidad lumínica no pueden ser discutidos sin ser diferenciados de los causados por los efectos de la intensidad lumínica y viceversa (Smith, 1982). Dado que las diferencias encontradas entre los tratamientos sin y con los regímenes de sombra reflejarían las respuestas a la irradiación (Weing, 2000a), otro aspecto importante relacionado con el ambiente lumínico maternal que requiere futuros estudios en *B. arvensis* es el efecto que genera la calidad

de luz debido al sombreado del canopeo (R:FR ratio) (Schmitt & Wulff, 1993; Smith & Whitelam, 1997).

CAPÍTULO VI

Discusión general

La presente tesis se enfocó en la plasticidad inter-generacional basándose en la hipótesis de que los efectos maternos pueden proveer una adaptación fenotípica a los ambientes locales (Galloway, 2005). La plasticidad adaptativa se evaluó para tres factores ambientales: (i) fertilización nitrogenada; (ii) disponibilidad hídrica y (iii) régimen de intensidad lumínica.

La principal ventaja de los fertilizantes nitrogenados es la de incrementar el crecimiento y producción de los cultivos. Sin embargo, produce un efecto secundario en la estructura y desarrollo de las comunidades de malezas. La intensidad de las consecuencias que el nitrógeno ejerce en los componentes poblacionales de dichas malezas va a depender de las variables ambientales, tales como disponibilidad hídrica, temperatura, entre otras (Mahn, 1988). Por otro lado, en hábitats disturbados como son los campos agrícolas, el ambiente de la planta se caracteriza por una heterogeneidad tanto espacial como temporal, siendo la distribución de nutrientes muy irregular y sitio específica (Miao *et al.*, 1991). Para entender la respuesta de las comunidades ante diferentes aplicaciones nitrogenadas, es necesario investigar los efectos directos e indirectos a largo plazo (Mahn, 1988).

En los ecosistemas semiáridos, los recursos ambientales, como el agua, los nutrientes del suelo y la biomasa de las plantas, atraviesan típicamente períodos de alta y baja abundancia. Períodos cortos ricos en recursos son generalmente desencadenados por la precipitación (Schwinning & Sala, 2004) cobrando interés el entendimiento de la competencia cultivo-maleza. Las transformaciones bioquímicas y biológicas asociadas a la disponibilidad hídrica, pueden ir desde la liberación rápida del nitrógeno por los microorganismos del suelo (Schwinning & Sala, 2004) hasta cambios fisiológicos en las plantas en desarrollo.

Según Thoday (1953), un grupo de individuos cuya flexibilidad fenotípica o plasticidad presenta un ajuste perfecto es debido a que posee una estabilidad genética tal que puede funcionar en todos los ambientes posibles, enfrentado así, cualquier cambio ambiental. Este hecho justificaría la adaptación de la especie en estudio al ambiente semiárido bonaerense considerado como un ambiente ampliamente impredecible. Es justamente en ambientes variables, donde la selección presiona a favor de individuos que desarrollen diferentes fenotipos para poder amortiguar los cambios ambientales (Thoday, 1953).

Los resultados expuestos en la presente tesis reflejan parte de la plasticidad fenotípica de *Buglossoides arvensis*, especialmente a través del efecto materno, herramienta con la cual se adapta al ambiente venidero.

Diferentes ambientes maternos causaron variaciones en el nivel de dormición primaria de las semillas de *B. arvensis* corroborándose la primera hipótesis propuesta (Ver sección 1.5). Coincidiendo con lo expuesto por Fenner (1991) para otras especies, tanto una disponibilidad hídrica reducida como un nivel elevado de nitrógeno en el suelo durante el desarrollo seminal, incrementaron la germinabilidad de la progenie. Este hecho pudo ser cuantificado, según lo hipotetizado, mediante el uso de modelos de tiempo térmico (Chantre *et al.*, 2009b). Entre los

parámetros evaluados, el tiempo térmico sub-óptimo requerido para germinar fue levemente menor para las semillas provenientes de plantas que estuvieron expuestas a estrés hídrico y no mostró diferencias significativas asociadas al régimen nitrogenado. En cuanto a la temperatura media máxima de germinación los resultados fueron muy contundentes, manifestando mayores valores (*p*<0,0001) tanto para el menor régimen hídrico como para el incremento en la fertilización nitrogenada. Esto indicaría que los factores ambientales evaluados no influyeron en la cantidad de grados térmicos por día que requieren acumular las semillas para germinar, pero sí modificaron la ventana donde puede efectuarse dicho proceso, ampliándola al derivar de ambientes de disponibilidades reducidas de agua y/o elevadas de nitrógeno.

Los resultados obtenidos indican que, ante un período de escasas precipitaciones, escenario muy factible en la zona semiárida, o ante una fertilización nitrogenada, situación común en cualquier cultivo o verdeo que se produzca en la zona, la descendencia de las semillas producidas de B. arvensis incrementará su temperatura máxima de germinación (menor dormición que el testigo). Este hecho aumentaría la probabilidad de que un porcentaje más elevado de las semillas recientemente incorporadas al banco, germinen desde mediados de febrero a mediados de marzo (fines del verano). Una presencia anticipada de malezas compitiendo requerirá un replanteo de las aplicaciones de herbicidas. Opciones de manejo químico, tanto para un verdeo como para un cultivo de invierno, incluyen el uso de sulfonilureas (Georgiev & Delchev, 2016; Richner, 2014; Istilart & Yanniccari, 2013) durante el barbecho, dado que proporciona residualidad y evitaría la implantación de las primeras cohortes de B. arvensis, o una aplicación post-emergente sobre cereales de invierno con algún herbicida selectivo, como ser carfentrazoneetil en mezcla con MCPA amina (CASAFE, 2015). Sin embargo, las condiciones agroclimáticas y económicas inherentes a una región semiárida hacen que las decisiones de manejo deban ser tomadas sobre la marcha sin permitir la existencia de "recetas fijas" que garanticen resultados satisfactorios.

Modelos cuantitativos vinculados con el tiempo térmico fueron ampliamente utilizados para analizar los efectos de la temperatura sobre la germinación de cultivos y malezas. Su principal utilidad radica en el modelado de la interacción entre ambas poblaciones de individuos (Trudgill *et al.*, 2005). Estas relaciones son muy dinámicas y numerosos factores pueden inducir cambios en el comportamiento poblacional, especialmente de las malezas, los que pueden impactar de manera importante al momento de determinar la realización de alguna labor a campo. Estudios que proporcionen datos que complejicen las entradas de estos modelos, son necesarios para poder obtener una mejor predicción a campo. En la presente tesis solo se evaluaron los efectos de la disponibilidad hídrica y nitrogenada, factores ampliamente variables en la región de estudio. Sin embargo, considerando que diversas variables influyen en la dormición y emergencia de las malezas a campo, sería importante realizar estudios sobre los efectos maternos asociados a la temperatura, fotoperiodo, así como la intensidad y calidad de la luz incidentes. Estas

evaluaciones serían de gran interés y utilidad para entender el sistema en su conjunto. Además, cambios en los sistemas productivos generan modificaciones en el ambiente que requieren de una continua actualización de los datos. A su vez, las poblaciones de malezas van modificándose a causa de la rotación de cultivos y de las prácticas empleadas, demandando la aplicación de estas metodologías en otras especies que se van tornando problema.

La causa fisiológica del fuerte impacto que provoca la fertilización nitrogenada sobre la dormición innata de *B. arvensis* es desconocida. La segunda hipótesis planteada en esta tesis (ver sección 1.5), la cual refiere a una variación en la sensibilidad hormonal ante el ABA y/o GA₃ por parte del embrión, queda refutada dado el similar comportamiento que mostraron las poblaciones evaluadas ante el agregado externo de dichas sustancias (Figura 3.4). Sin embargo, sería pertinente la realización de estudios adicionales utilizando otras giberelinas activas para verificar una posible sensibilidad diferencial hacia las mismas en poblaciones provenientes de distintos ambientes nitrogenados. El agregado de inhibidores hormonales tampoco generó grandes diferencias entre el comportamiento germinativo de sN y cN, rechazando la hipótesis planteada asociada a una producción *in situ* diferencial de ABA o GAs, dependiendo del ambiente materno.

Dado que con los ensayos realizados no se pudieron explicar las diferencias en los porcentajes germinativos debido a la fertilización nitrogenada maternal, se denota la necesidad de realizar mediciones en los niveles hormonales presentes en las semillas. Llevar a cabo este estudio durante la embriogénesis revelaría si las causas de las variaciones en los niveles de dormición primaria se deben a diferencias en el pico de ABA.

Chantre *et al.* (2009a) describen al banco de semillas de *B. arvensis* como persistente de corta duración (*sensu* Baskin & Baskin, 1998). En la región semiárida bonaerense el clima no es similar entre años, dando impredecibilidad al sistema especialmente en lo referente a las precipitaciones. El hecho de la fuerte influencia materna en características de la progenie hace que se vayan "aclimatando" a los ambientes venideros. El banco va "actualizándose" año a año y de esta manera "evoluciona" junto con el clima. La producción de semillas con diferentes grados de dormición genera un banco con diversos requisitos para germinar. Por lo tanto, no resulta tan grave para la especie en qué momento se disturbe el sistema, porque de todas maneras contará con una proporción de semillas que puedan responder a las condiciones prevalentes (Fenner, 1985).

El banco de semillas refleja parcialmente la historia de la vegetación y contribuye a su futuro. Si la composición de especies del banco de semillas de un área agrícola es determinada, y más aún, si se conocen los patrones de emergencia respectivos, se posee un conocimiento muy valioso que proporciona las bases para decidir las técnicas de control (Fenner, 1985) siendo especialmente efectivo en el manejo del banco de semillas a largo plazo.

La plasticidad de *B. arvensis* deriva en que su tamaño y arquitectura varió en función de los recursos disponibles. La tercera hipótesis (ver sección 1.5) supone cambios morfo-fisiológicos

en las semillas debido a los ambientes en donde se produjeron las mismas. Suficiente evidencia fue encontrada para confirmarla ante variaciones en los factores ambientales de disponibilidad hídrica, nitrogenada e intensidad lumínica. Es común que, dentro de una comunidad de una especie determinada, el tamaño seminal varíe ampliamente. Estudios empíricos han descripto las ventajas y desventajas de los diferentes tamaños de semillas sugiriendo que un tamaño será óptimo solo bajo una combinación determinada de factores ambientales (Muller-Landau, 2010).

Cuando se analizaron las consecuencias de diferentes regímenes lumínicos sobre el tamaño seminal, se examinó la performance media en cada ambiente, no evaluándose posibles variaciones inter-muestrales dentro de cada nivel lumínico. Por el contrario, en los estudios realizados bajo diferentes condiciones hídricas y nitrogenadas se cuantificaron dichas variaciones. Un aspecto común en el resultado de todos los factores ambientales analizados es el peso seminal como mejor indicador ambiental. En el caso del régimen lumínico, no se encontraron diferencias en el perímetro seminal, pero si en el peso de mil semillas debido al ambiente materno. Cuando se evaluaron las condiciones hídricas y nitrogenadas, el peso seminal fue más preciso en estimar el tamaño embrional en comparación al perímetro. Además, en muchos casos las semillas más livianas resultaron ser no viables, posiblemente por ser vanas, sin corresponder exactamente a los menores perímetros registrados.

En general, las semillas de mayor tamaño generan plántulas con mayor vigor inicial (Muller-Landau, 2010). Las plántulas que presentan un mayor desarrollo de manera anticipada respecto a las plántulas vecinas, sufren una menor mortalidad y alcanzan una mayor fecundidad exponiendo una relación muy cercana entre el tamaño y el *fitness*. El tamaño de un individuo está determinado por características intrínsecas (posiblemente controladas genéticamente) y/o extrínsecas, es decir de los factores ambientales (Stanton, 1985) imperantes durante su ontogenia seminal y los presentes al momento de la implantación y posterior desarrollo. De lo anterior se desprende la dependencia que presenta el *fitness* a un crecimiento temprano y la posterior captura de espacio. Ambos aspectos, a su vez, se relacionan con el tamaño inicial y el momento de emergencia (Stanton, 1985).

En *B. arvensis* las semillas de mayor tamaño producen plántulas más grandes que emergen antes. Esta situación se ve magnificada cuando las plantas madres son fertilizadas con nitrógeno, siendo el incremento en la temperatura media máxima la posible explicación de la anticipada emergencia. Por lo tanto, hay que considerar ante la presencia de *B. arvensis* en un lote, que luego de un cultivo al que se lo ha fertilizado, al siguiente año las plántulas que se generen serán potencialmente más competitivas hacia el cultivo, siempre y cuando se den las condiciones ambientales para su crecimiento y desarrollo.

Dentro de cada nivel de condición ambiental evaluada en esta tesis, las plantas de *B. arvensis* que alcanzaron mayores tamaños produjeron un mayor número de semillas. Sin embargo, no se puede asegurar que el tamaño final esté relacionado con el tamaño inicial de la plántula,

como ocurre en numerosas especies (Stanton, 1984; Wulff, 1986c; Winn, 1988; Hendrix *et al.*, 1991). Estudios donde se realice un seguimiento durante todo el ciclo de la especie dilucidarían esta incertidumbre.

En cuanto al efecto de los factores ambientales analizados sobre la cantidad de semillas, los resultados fueron variables. La fertilización nitrogenada no mostró un efecto directo sobre la producción seminal (p>0,05). De darse un mayor aporte al banco bajo este escenario sería por el efecto que causa en la biomasa aérea, la cual se relaciona directamente con el out-put reproductivo (Tabla 4.2). La disponibilidad hídrica reducida disminuyó fuertemente el tamaño de las plantas madres y a su vez, y de manera independiente, la cantidad de semillas que las mismas produjeron. Bajo un contexto de estrés hídrico es de esperar este resultado dada la carencia del recurso, y a su vez, quedó manifestada la sencilla inhabilidad de la especie a producir bajo estas circunstancias. En cuanto al régimen lumínico, se observó un incremento en la biomasa aérea con la cantidad de luz recibida sin embargo la producción seminal fue mayor en condiciones de intensidad lumínica intermedia. Considerando los resultados de las tres intensidades lumínicas en conjunto, no se observó un trade-off entre número y tamaño seminal (mayor tamaño a expensas de un menor número de semillas), por lo que se sugiere una distribución diferencial de recursos. El desarrollo bajo condiciones parciales de intensidad lumínica, podría significarle dos cosas a B. arvensis. Por un lado, puede tratarse de un ambiente propicio y por esta razón las plantas se desarrollan más eficientemente (mayor índice de cosecha: producción seminal por unidad de biomasa aérea). O bien, puede ser registrado como condición de competencia y por esta razón las plantas pueden generar más descendencia para asegurar su persistencia en el sistema. La selección natural actúa sobre el fitness en sí mismo más que sobre los componentes del fitness. Desafortunadamente, resulta imposible medir de manera integrada el fitness en poblaciones naturales. En su lugar, debemos estudiar las interacciones cuantitativas entre los componentes del fitness y las presiones selectivas actuando sobre dichos componentes (Stanton, 1985).

El heteroblastismo (solo una fracción de semillas germina en un momento dado), es una de las consecuencias del efecto materno ambiental e influencia la habilidad colonizadora de las semillas de malezas (Benech-Arnold & Sánchez, 1995). La presente tesis contribuye a un mejor entendimiento del origen del heteroblastismo observado en las poblaciones de semillas de *B. arvensis* e infiere en su significancia ecológica y agro-productiva. Fenner (1985) describe la importancia ecológica de la producción de semillas dimórficas en una misma planta madre. Dichas variaciones en la descendencia pueden deberse a grandes diferencias de forma y estructuras, a solo un cambio de tamaño, o que el polimorfismo no sea visible pero las semillas sean fisiológicamente polimorfas en sus requerimientos para germinar. El momento en que germinan las semillas provenientes de una misma planta suele encontrarse relacionado con su posición en la inflorescencia, adoptando la especie dos maneras de diseminación, en el tiempo y

en el espacio. De esta manera se incrementa el rango de condiciones ambientales donde una determinada generación se encuentra expuesta. Los resultados de esta tesis permitieron registrar diferencias en tamaño y emergencia según la localización basal o apical de un mismo tallo corroborándose de esta manera la hipótesis que plantea una conducta en la emergencia distintiva entre semillas provenientes de diferentes zonas de la misma inflorescencia. Las semillas del género Buglossoides no poseen estructuras especiales para la dispersión; de hecho, presentan barocoria, auto-dispersión por gravedad. El antiguo nombre de la especie, Lithospermum arvense, ya hacía referencia a sus semillas con forma de piedra y elevado peso. Su morfología, sumada a que suelen permanecer adheridas a la planta madre, hacen que el radio de dispersión primaria sea menor a los 2 m de distancia de su origen (Bischoff, 2005; Bonn, 2005). Las semillas de mayor tamaño mostraron una mayor germinabilidad que las pequeñas, lo cual tiene sentido si van a germinar próximas a sus progenitoras en un ambiente muy similar al que fueron formadas. Por el contrario, semillas más chicas podrán dispersarse un poco más, enfrentándose posiblemente a microambientes diferentes. El hecho de poseer un nivel de dormición primario levemente más profundo, colabora para una germinación y emergencia propicia a efectuarse cuando se garanticen las condiciones para su establecimiento.

Independientemente del tamaño seminal, la emergencia estuvo fuertemente influenciada por el ambiente materno, siendo mayor cuando las semillas se desarrollaron bajo un régimen de menor intensidad lumínica, condiciones de estrés hídrico y alta disponibilidad nitrogenada. Para una especie anual, el momento de la emergencia es clave y determina en gran medida el éxito posterior de la especie. Esta situación se ve magnificada en ambientes impredecibles, donde el desarrollo de una gran cohorte de plántulas emergidas luego de una leve precipitación seguida de una fuerte escases hídrica, puede causar una gran mortandad, significando una reducción importante del banco de semillas y por ende la pérdida del material genético en el sistema. La disponibilidad hídrica es impredecible e incontrolable en ambientes áridos y semiáridos (Wright, 1971). La menor dormición primaria de las semillas generadas bajo condiciones hídricas restrictivas aseguraría una germinación ante una cantidad suficiente del recurso hídrico. En cuanto a la mayor germinabilidad que presentan las semillas generadas bajo una menor intensidad lumínica se puede relacionar con una rápida cobertura del espacio evitando un posible efecto del sombreado por competencia interespecífica. Algo similar debe ocurrir con la descendencia proveniente de una elevada fertilidad nitrogenada. Es de esperar que, ante una mayor disponibilidad de recursos, como ocurre en un ambiente rico en nutrientes, haya una mayor cantidad de individuos compitiendo. Una emergencia tardía significaría una desventaja para capturar recursos en lugares ocupados por individuos establecidos.

Tanto la fecha de emergencia como el tamaño de las plántulas es clave en la competencia inicial. El tamaño de los cotiledones se relacionó directamente con el tamaño seminal pero no

mostró diferencias debido al ambiente materno, refutando en este atributo parte de la tercera hipótesis propuesta (ver sección 1.5). Por lo tanto, las semillas basales manifestaron ser potencialmente más competitivas por emerger antes y poseer mayores dimensiones. Por otro lado, es aceptada esta hipótesis al analizar el hipocótile de plántulas procedentes de diferentes ambientes. El mismo fue sensible a los factores ambientales evaluados, mostrando mayores dimensiones cuando provino de ambientes de menor régimen lumínico, menor disponibilidad nitrogenada e hídrica. Sin embargo, estas dos últimas tendencias solo se evidenciaron uno de los dos años evaluados. En el caso del régimen lumínico, podría tratarse de una estrategia para evitar el sombreado, mientras que en el régimen hídrico habría que analizar si el menor largo del hipocótile se debe a una redistribución diferencial de recursos que favorece un mayor desarrollo radicular a fin de contribuir a la exploración del suelo en busca de agua.

Numerosos trabajos mencionan que los efectos maternales se manifiestan más fuertemente en la descendencia cuando la misma se desarrolla en situaciones de competencia (Galloway, 1995). Si este hecho se llegara a comprobar en *B. arvensis*, reforzaría la importancia de conocer las consecuencias del efecto materno en esta especie, dado que al ser una maleza siempre va a crecer en condiciones de estrés competitivo debido al cultivo.

Los resultados expuestos en la presente tesis sugieren que los efectos maternos ambientales, como la disponibilidad hídrica, nitrogenada y de intensidad lumínica contribuyen a la variación en el nivel de dormición primaria en *B. arvensis* y en características morfo-fisiológicas del estado de plántula. Las diferencias observadas representan una respuesta evolutiva muy rápida, dado que en una primera generación (F₁) se manifiesta dichos efectos. Desde el punto de vista ecológico, la información aquí proporcionada sugiere, que se trata de una respuesta plástica adaptativa de la especie a los diferentes ambientes. Es decir que, gracias a estas respuestas plásticas al medio, los individuos pueden mantener su funcionamiento y consecuentemente su *fitness* en los respectivos ambientes venideros (Sultan, 1996). Por otro lado, los resultados aquí expuestos presentan valor desde un enfoque agrícola y económico si se hace uso de ellos para la elaboración de modelos o estrategias de manejo que minimicen la aplicación de insumos según las emergencias esperadas en función de las condiciones ambientales circundantes. Para reducir el uso de herbicidas, es necesario el desarrollo de modelos que cuantifiquen los efectos del cultivo sobre la dinámica de las malezas (Gardarin & Colbach, 2015).

BIBLIOGRAFÍA

AARSSEN LW & BURTON SM (1990) Maternal effects at four levels in *Senecio vulgaris* (Asteraceae) grown on a soil nutrient gradient. *American Journal of Botany* 77 (9), 1231-1240.

ACKERSON RC (1984) Abscisic acid and precocious germination in soybeans. *Journal of Experimental Botany* **35** (3), 414-421.

ALBORESI A, GESTIN C, LEYDECKER MT, BEDU M, MEYER C & TRUONG HN (2005) Nitrate, a signal relieving seed dormancy in *Arabidopsis*. *Plant*, *cell* & *environment* **28** (4), 500-512.

ALI-RACHEDI S, BOUINOT D, WAGNER MH, BONNET M, SOTTA B, GRAPPIN P & JULLIEN M (2004) Changes in endogenous abscisic acid levels during dormancy release and maintenance of mature seeds: studies with the Cape Verde Islands ecotype, the dormant model of *Arabidopsis thaliana*. *Planta* **219** (3), 479-488.

ALVARADO V & BRADFORD KJ (2002) A hydrothermal time model explains the cardinal temperatures for seed germination. *Plant, Cell and Environment* **25**, 1061-1069.

ANDRADE A, VIGLIOCCO A, ALEMANO S, ALVAREZ D & ABDALA G (2009) Differential accumulation of abscisic acid and its catabolites in drought-sensitive and drought-tolerant sunflower seeds. *Seed Science Research* **19** (4), 201-211.

ARC E, GALLAND M, GODIN B, CUEFF G & RAJJOU L (2013) Nitric oxide implication in the control of seed dormancy and germination. *Frontiers in Plant Science* **4** – 346, 1-13.

ASAV Ü & KADIOĞLU İ (2014) Rusya Federasyonu'ndanTürkiye'yeİthal Edilmek Üzere Trabzon Limanı'na Gelen Buğdaylardaki Yabancı Ot Tohumlarının Belirlenmesi. *Iğdır University Journal of the Institute of Science and Technology* **4** (4), 29-36.

BAESSLER C & KLOTZ S (2006) Effects of changes in agricultural land-use on landscape structure and arable weed vegetation over the last 50 years. *Agriculture, ecosystems & environment* **115** (1), 43-50.

BAKKER JP, POSCHLOD P, STRYKSTRA RJ, BEKKER RM & THOMPSON K (1996) Seed banks and seed dispersal: important topics in restoration ecology §. *Acta Botanica Neerlandica* **45** (4), 461-490.

BALAGUER L, MARTÍNEZ-FERRI E, VALLADARES F, PÉREZ-CORONA ME, BAQUEDANO FJ, CASTILLO FJ & MANRIQUE E (2001) Population divergence in the plasticity of the response of *Quercus coccifera* to the light environment. *Functional Ecology* **15**, 124-135.

BALOCH HA, DI TOMMASO A & WATSON AK (2001) Intrapopulation variation in *Abutilon theophrasti* seed mass and its relationship to seed germinability. *Seed Science Research* **11** (4), 335-343.

BARTELS PG & WATSON CW (1978) Inhibition of carotenoid synthesis by fluridone and norflurazon. *Weed Science* **26** (2), 198-203.

BASKIN CC & BASKIN JM (1998) Seeds: ecology, biogeography, and, evolution of dormancy and germination. Academic Press. San Diego, USA.

BATLLA D & BENECH-ARNOLD RL (2003) A quantitative analysis of dormancy loss dynamics in *Polygonum aviculare* L. seeds: Development of a thermal time model based on changes in seed population thermal parameters. *Seed Science Research* **13**, 55-68.

BELLO IA, OWEN MDK & HATTERMAN-VALENTI HM (1995) Effect of shade on velvetleaf (*Abutilon theophrasti*) growth, seed production, and dormancy. *Weed Technology* **9** (3), 452-455.

BENECH-ARNOLD RL, SÁNCHEZ RA, FORCELLA F, KRUK BC & GHERSA CM (2000) Environmental control of dormancy in weed seed banks in soil. *Field Crops Research* **67** (2), 105-122.

BENECH-ARNOLD RL & SÁNCHEZ RA (1995) Modeling Weed Seed Germination. En: *Seed development and germination* (eds. KIGEL J & GALILI G), 545-566. CRC press, 270 Madison Avenue, New York, United States.

BENECH-ARNOLD RL, FENNER M & EDWARDS PJ (1991) Changes in germinability, ABA content and ABA embryonic sensitivity in developing seeds of Sorghum bicolor (L.) Moench. induced by water stress during grain filling. *New Phytologist* **118** (2), 339-347.

BETHKE PC, LIBOUREL IG & JONES RL (2006) Nitric oxide reduces seed dormancy in Arabidopsis. *Journal of experimental botany* **57** (3), 517-526.

BEWLEY JD (1997) Seed germination and dormancy. The plant cell 9 (7), 1055-1066.

BIANCO J, GARELLO G & LE PAGE-DEGIVRY MT (1994) Release of dormancy in sunflower embryos by dry storage: involvement of gibberellins and abscisic acid. *Seed science research* **4** (2), 57-62.

BISCHOFF A (2005) Analysis of weed dispersal to predict chances of re-colonisation. *Agriculture, Ecosystems & Environment* **106** (4), 377-387.

BISCHOFF A & MAHN E-G (2000) The effects of nitrogen and diaspore availability on the regeneration of weed communities following extensification. *Agriculture, Ecosystems & Environment* 77, 237-246.

BISCHOFF A (1999) Zeitliche und räumliche Dynamik segetaler Populationen von *Lithospermum arvense* L. und ihre Beeinflussung durch Bewirtschaftungsfaktoren. *Flora* **194** (1), 127-136.

BONN S (2005). Dispersal of plants in the Central European landscape-dispersal processes and assessment of dispersal potential examplified for endozoochory (Doctoral dissertation).

BORZA JK, WESTERMAN PR & LIEBMAN M (2007) Comparing estimates of seed viability in three foxtail (*Setaria*) species using the imbibed seed crush test with and without additional tetrazolium testing. *Weed Technology* **21** (2), 518-522.

BRADFORD KJ (2002) Applications of hydrothermal time to quantifying and modeling seed germination and dormancy. *Weed Science* **50**, 248-260.

BRADFORD KJ (1995) Water Relations in Seed Germination. En: *Seed development and germination* (eds. KIGEL J & GALILI G), 351-396. CRC press, 270 Madison Avenue, New York, United States.

BRADFORD KJ & TREWAVAS A J (1994) Sensitivity thresholds and variable time scales in plant hormone action. *Plant Physiology* **105** (4), 1029-1036.

BRAINARD DC, BELLINDER RR & DITOMMASO A (2005) Effects of canopy shade on the morphology, phenology, and seed characteristics of Powell amaranth (*Amaranthus powellii*). *Weed Science* **53**, 175-186.

BRASS G (2006) Emergencia de la maleza *Lithospermum arvense* (yuyo moro) en el cultivo de trigo. Tesis de grado, Universidad Nacional del Sur, Bahía Blanca, Argentina: 29 pp.

BUCKLEY R (1981) Alien plants in central Australia. *Botanical Journal of Linnean Society* **82**, (4) 369-379.

BÜKÜN B (2004) The weed flora of winter wheat in Sanliurfa, Turkey. *Pakistan Journal of Biological Sciences (Pakistan)* **7** (9), 1530-1534.

CAVE RL, BIRCH CJ, HAMMER GL, ERWIN JE & JOHNSTON ME (2011) Cardinal temperatures and thermal time for seed germination of *Brunonia australis* (Goodeniaceae) and *Calandrinia sp.*(Portulacaceae). *HortScience* **46** (5), 753-758.

CECCATO DV, BERTERO HD & BATLLA D (2011) Fuentes de tolerancia al brotado precosecha en quínoa (*Chenopodium quinoa* Willd.). Efecto de las condiciones ambientales sobre el nivel de dormición. Comunicación técnica. *Análisis de semillas* **5** (17), 50-55.

CECCHI L, COPPI A, HARTMUT HH & SELVI F (2014) Non-monophyly of *Buglossoides* (Boraginaceae: Lithospermeae): Phylogenetic and morphological evidence for the expansion of *Glandora* and reappraisal of *Aegonychon*. *Taxon* **63** (5), 1065-1078.

CHANTRE GR, SABBATINI MR, ORIOLI GA & GIGÓN R (2008) Requerimientos Térmicos y Efecto del Ácido Giberélico en la Ruptura de la Dormición en Semillas de *Lithospermum arvense* L. En XXVI Congresso Brasileiro da Ciência das Plantas Daninhas, XVIII Congreso de la Asociación Latinoamericana de Malezas. Ouro Preto, Brasil. 7 pp. ISBN (pp. 978-85).

CHANTRE GR, SABBATINI MR & ORIOLI G (2009a) Effect of burial depth and soil water regime on the fate of *Lithospermum arvense* seeds in relation to burial time. *Weed Research* **49**, 81-89.

CHANTRE GR, BATLLA D, SABBATINI MR & ORIOLI G (2009b) Germination parameterization and development of an after-ripening thermal-time model for primary dormancy release of *Lithospermum arvense* seeds. *Annals of Botany* **103**, 1291–1301.

CHANTRE GR (2010) Ecología del banco de semillas de *Lithospermum arvense* L. Modelado de la dormición y germinación. Tesis de Doctorado, Universidad Nacional del Sur, Bahía Blanca, Argentina: 131 pp.

CHIEN CT, KUO-HUANG LL & LIN TP (1998) Changes in Ultrastructure and Abscisic Acid Level, and Response to Applied Gibberellins in *Taxus mairei* Seeds Treated With Warm and Cold Stratification. *Annals of Botany* **81**(1), 41-47.

CHO H-T & COSGROVE DJ (2005) C4. Expansins as Agents in Hormone Action. En: *Plant hormones: biosynthesis, signal transduction, action* (ed. PJ DAVID) 63-94. Kluwer Academic Publishers, 3300 AA Dordrecht, The Netherlands.

CHOE HS, CHU C, KOCH G, GORHAM J & MOONEY HA (1988) Seed weight and seed resources in relation to plant growth rate. *Oecologia* **76** (1), 158-159.

COHEN JI & DAVIS JI (2009) Nomenclatural changes in *Lithospermum* (Boraginaceae) and related taxa following are assessment of phylogenetic relationships. *Brittonia* **61** (2), 101-111.

COLEMAN JS, MCCONNAUGHAY KDM & ACKERLY DD (1994) Interpreting phenotypic variation in plants. *Trends in Ecology & Evolution* **9**, 187-191.

CONG C, WANG Z, LI R, LI L, BU D & WANG J (2014) Evaluation of Weed Efficacy and Crop Safety of Fluorochloridone in China. *Weed Technology* **28** (4), 721-728.

COPPI A, SELVI F & BIGAZZI M (2006) Chromosome studies in Mediterranean species of Boraginaceae. *Flora Mediterranea* **16**, 253-274.

CRESSWELL EG & GRIME JP (1981) Induction of a light requirement during seed development and its ecological consequences. *Nature* **291**, 583-585.

CUMBERFORD G & HEBARD A (2015). Ahi flower oil: A novel non-GM plant-based omega-3+6 source. *Lipid Technology* **27** (9), 207-210.

DAVIES PJ (2005) *Plant hormones: biosynthesis, signal transduction, action* (ed. PJ DAVIES) Kluwer Academic Publishers, 3300 AA Dordrecht, The Netherlands.

DEBEAUJON I & KOORNNEEF M (2000) Gibberellin requirement for Arabidopsis seed germination is determined both by testa characteristics and embryonic abscisic acid. *Plant physiology* **122** (2), 415-424.

DI LENNA JP (2012) Relación dosis-respuesta del herbicida metsulfuròn-metil sobre *Lithospermum arvense* L. en relación al estado fenológico y al nivel de fertilización nitrogenada. Tesis de grado, Universidad Nacional del Sur, Bahía Blanca, Argentina: 34 pp.

DONOHUE K (1999) Seed dispersal as a maternally influenced character: mechanistic basis of maternal effects and selection on maternal characters in an annual plant. The American Naturalist 154 (6), 674-689.

DONOHUE K & SCHMITT J (1998) Maternal environmental effects in plants: adaptive plasticity? In: *Maternal effects as adaptations* (eds TA Mousseau & CW Fox), 137-158. Oxford University Press, NY, USA.

FAWCETT RS & SLIFE FW (1978) Effects of field applications of nitrate on weed seed germination and dormancy. *Weed Science* **26**, 594-596.

FELLNER M & SAWHNEY VK (2001) Seed germination in a tomato male-sterile mutant is resistant to osmotic, salt and low-temperature stresses. *TAG Theoretical and Applied Genetics* **102** (2), 215-221.

FENNER M (1991) The effects of the parent environment on seed germinability. *Seed Science Research* **1**, 75-84.

FENNER M (1985) *Seed Ecology* (eds. DUNNET GM & GIMINGHAN CH) Chapman and Hall Ltd, 29 West 35th Street, New York, United States.

FINCH-SAVAGE WE & LEUBNER-METZGER G (2006) Seed dormancy and the control of germination. *New Phytologist* **171**(3), 501-523.

FINKELSTEIN RR (2005) The Role of Hormones during Seed Development and Germination. En: *Plant hormones: biosynthesis, signal transduction, action* (ed. PJ DAVID), 513-537. Kluwer Academic Publishers, 3300 AA Dordrecht, The Netherlands.

FIRN RD (1986) Growth substance sensitivity: The need for clearer ideas, precise terms and purposeful experiments. *Physiologia plantarum* **67** (2), 267-272.

FRANKLIN KA (2008) Shade avoidance. New Phytologist 179, 930-944.

FUA JM & MACKIE WBC (1981) Mixtures of bifenox, dicamba and MCPA for post emergence broadleaved weed control in cereals. In: 1981 *Proceedings of the Sixth Australian Conference*.

Vol. 1 (13-18 September, Gold Coast, Queensland, Australia). 69-74. Queensland Weed Society, Queensland, Australia.

GALANTINI JA, IGLESIAS JO, MIGLIERINA AM, ROSELL RA & GLAVE A (1992) Rotación y fertilización en sistemas de producción de la Región Semiárida Bonaerense. I. Productividad (calidad y rendimiento) del trigo. *Revista Facultad de Agronomía, Universidad de Buenos Aires, Argentina* 13, 67-75.

GALLOWAY LF & ETTERSON JR (2009) Plasticity to canopy shade in a monocarpic herb: within- and between-generation effects. *New Phytologist* **182**, 1003-1012.

GALLOWAY LF & ETTERSON JR (2007) Transgenerational plasticity is adaptive in the wild. *Science* **318** (5853), 1134-1136.

GALLOWAY LF (2005) Maternal effects provide phenotypic adaptation to local environmental conditions. *New Phytologist* **166**, 93-100.

GALLOWAY LF (2001) The effect of maternal and paternal environments on seed characters in the herbaceous plant *Campanula americana* (Campanulaceae). *American Journal of Botany* **88** (5), 832-840.

GALLOWAY LF (1995) Response to natural environmental heterogeneity: maternal effects and selection on life-history characters and platicities in *Mimulus guttatus*. *Evolution* **49** (6), 1095-1107.

GARCIARRUBIO A, LEGARIA JP & COVARRUBIAS AA (1997) Abscisic acid inhibits germination of mature *Arabidopsis* seeds by limiting the availability of energy and nutrients. *Planta* **203** (2), 182-187.

GARDARIN A & COLBACH N (2015) How much of seed dormancy in weeds can be related to seed traits? *Weed Research* **55** (1), 14-25.

GARDARIN A, DÜRRB C & COLBACH N (2012) Modeling the dynamics and emergence of a multispecies weed seed bank with species traits. *Ecological Modelling* **240**, 123-138.

GARRETT AO (1913) Some introduced plants of Salt Lake County, Utah. *Torrey Botanical Society* **13** (10), 237-241.

GEORGIEV M & DELCHEV G (2016) Achievements and problems in the weed control in barley (*Hordeum vulgare* L.). *Scientific Papers. Series A. Agr*onomy **LIX**, 294-297.

GIGÓN R, LABARTHE F, LAGEYRE LE, VIGNA MR, LÓPEZ MR, VERGARA MF & VARELA PE (2008) Comunidades de malezas en cultivos de trigo en el Sur y Sudoeste de la provincia de Buenos Aires. *VII Congreso Nacional de Trigo*. Santa Rosa, La Pampa, Argentina: 5.

GLAVE A (2006) Influencia climática en el Sudoeste Bonaerense y Sudeste de la Pampa. *Acaecer* **31** (360), 18-23.

GOGGIN DE & POWLES SB (2014) Fluridone: a combination germination stimulant and herbicide for problem fields? *Pest management science* **70** (9), 1418-1424.

GÖKALP Ö & ÜREMIŞ İ (2015) Mardin'de buğday ürününe karışan yabancı ot tohumlarının belirlenmesi. *Mustafa Kemal Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi* **20** (1) 23-30.

GÓMEZ L, NAKAMA V & PURICELLI C (1981) Carta detallada de suelos Estación Experimental Agropecuaria de INTA Bordenave escala 1:10000. Informe Interno INTA.

GONAI T, KAWAHARA S, TOUGOU M, SATOH S, HASHIBA T, HIRAI N, NOBUHIRO H, KAWAIDE H, KAMIYA Y & YOSHIOKA T (2004) Abscisic acid in the thermoinhibition of lettuce seed germination and enhancement of its catabolism by gibberellin. *Journal of Experimental Botany* **55** (394), 111-118.

GRAEBER KAI, NAKABAYASHI K, MIATTON E, LEUBNER-METZGER G & SOPPE WJ (2012) Molecular mechanisms of seed dormancy. *Plant, Cell & Environment* **35** (10), 1769-1786.

GRAPPIN P, BOUINOT D, SOTTA B, MIGINIAC E & JULLIEN M (2000) Control of seed dormancy in *Nicotiana plumbaginifolia*: post-imbibition abscisic acid synthesis imposes dormancy maintenance. *Planta* **210** (2), 279-285.

GROOT SPC & KARSSEN CM (1987) Gibberellins regulate seed germination in tomato by endosperm weakening: a study with gibberellin-deficient mutants. *Planta* **171** (4), 525-531.

GUTTERMAN Y (2000) Maternal Effects on Seeds During Development. En *Seeds: the ecology of regeneration in plant communities* (Ed. FENNER M), 59-84. CABI Publishing, 10 E 40th Street, Suite 3230, New York, United States.

HALPERN SL (2005) Sources and consequences of seed size variation in *Lupinus perennis* (Fabaceae): adaptive and non-adaptive hypotheses. *American Journal of Botany* **92** (2), 205-213.

HEAP (2009) Heap, I. The International Survey of Herbicide Resistant Weeds. Online. Internet.

Available www.weedscience.org, http://weedscience.org/details/case.aspx?ResistID=5612.

HENDRIX SD & TRAPP EJ (1992) Population Demography of *Pastinaca sativa* (Apiaceae): Effects of Seed Mass on Emergence, Survival, and Recruitment. *American Journal of Botany* **79** (4), 365-375.

HENDRIX SD, NIELSEN E, NIELSEN T & SCHUTT M (1991) Are seedlings from small seeds always inferior to seedlings from large seeds? Effects of seed biomass on seedling growth in *Pastinaca sativa* L. *New Phytologist*, **119** (2), 299-305.

HENDRIX SD (1984) Variation in seed weight and its effects on germination in *Pastinaca sativa* L. (Umbelliferae). *American Journal of Botany* **71** (6), 795-802.

HOAGLAND BW & BUTHOD A (2005) Vascular flora of a site along the Arkansas River, Pawnee County, Oklahoma. *Oklahoma Native Plant Record* **5** (1).

HOLDSWORTH MJ, BENTSINK L & SOPPE WJ (2008) Molecular networks regulating Arabidopsis seed maturation, after-ripening, dormancy and germination. *New Phytologist* **179** (1), 33-54.

HONĚK A & MARTINKOVÁ Z (2002) Effects of individual plant phenology on dormancy of *Rumex obtusifolius* seeds at dispersal. *Weed Research* **42** (2), 148-155.

HOOLEY R (1992) The responsiveness of *Avena fatua* aleurone protoplasts to gibberellic acid. *Plant growth regulation* **11** (1), 85-89.

HOWE HF & RICHTER WM (1982) Effects of seed size on seedling size in *Virola surinamensis*; a within and between tree analysis. *Oecologia* **53** (3), 347-351.

HUBER H, LUKÁCS S & WATSON MA (1999) Spatial structure of stoloniferous herbs: an interplay between structural blue-print, ontogeny and phenotypic plasticity. *Plant Ecology* **141** (1), 107-115.

INOE K & YAMAMOTO R (1977) The growth inhibitors in sugar beet seed balls: IV. influences of nitrogen fertilizers given to maturing sugar beet on the growth inhibitors contents in seed balls. *Japanese Journal of Crop Science* **46**, 306-312.

IRASSAR JI (2008) Eficacia del herbicida HUSSAR® (metsufurón + iodosulfurón) sobre la maleza *Lithospermum arvense* bajo diferentes niveles de fertilización nitrogenada. Tesis de grado, Universidad Nacional del Sur, Bahía Blanca, Argentina: 29 pp.

ISTILART C & YANNICCARI M (2013) Análisis de la evolución de las malezas en cereales de invierno durante 27 años en la zona sur de la pampa húmeda argentina. *Actualización técnica en cultivos de cosecha fina 2012/13*, 113.

JACOBSEN JV, PEARCE DW, POOLE AT, PHARIS RP & MANDER LN (2002) Abscisic acid, phaseic acid and gibberellin contents associated with dormancy and germination in barley. *Physiologia Plantarum* **115** (3), 428-441.

JOHNSTON IM (1954) Studies in the Boraginaceae XXVI. Further revaluations of the genera of the Lithospermeae. *Journal of the Arnold Arboretum* **35**, 1-81.

KALISZ S (1989) Fitness consequences of mating system, seed weight, and emergence date in a winter annual, *Collinsia verna*. *Evolution* **43** (3), 1263-1272.

KAMKAR B, AL-ALAHMADI MJ, MAHDAVI-DAMGHANI A & VILLALOBOS FJ (2012) Quantification of the cardinal temperatures and thermal time requirement of opium poppy (*Papaver somniferum* L.) seeds to germinate using non-linear regression models. *Industrial crops and products*, **35** (1), 192-198.

KARIMMOJENI H, BAZRAFSHAN AH, MAJIDI MM, TORABIAN S & RASHIDI B (2014) Effect of maternal nitrogen and drought stress on seed dormancy and germinability of *Amaranthus retroflexus*. *Plant Species Biology* **29** (3), e1-e8.

KARSSEN CM (1995) Hormonal Regulation of Seed Development, Dormancy, and Germination Studied by Genetic Control. En: *Seed development and germination* (eds. KIGEL J & GALILI G), 333-350. CRC press, 270 Madison Avenue, New York, United States.

KERMODE AR (2005) Role of abscisic acid in seed dormancy. *Journal of Plant Growth Regulation* **24** (4), 319-344.

KHAN MA & UNGAR IA (1984) The effect of salinity and temperature on the germination of polymorphic seeds and growth of *Atriplex triangularis* Willd. *American Journal of Botany* **71** (4), 481-489.

KITAJIMA K & FENNER M (2000) Ecology of Seedling Regeneration. En *Seeds: the ecology of regeneration in plant communities* (Ed. FENNER M), 331-360. CABI Publishing, 10 E 40th Street, Suite 3230, New York, United States.

KRÜGER H (2015) Secuencias de cultivos con trigo para el ambiente semiárido bonaerense: rendimientos y efectos sobre el suelo. *Ediciones INTA. Pp 52*.

KUSUMOTO D, CHAE SH, MUKAIDA K, YONEYAMA K, YONEYAMA K, JOEL DM & TAKEUCHI Y (2006) Effects of fluridone and norflurazon on conditioning and germination of *Striga asiatica* seeds. *Plant Growth Regulation* **48** (1), 73-78.

LACEY E, SMITH S & CASE A (1997) Parental effects on seed mass: seed coat but not embryo/endosperm effects. *American Journal of Botany* **84** (11), 1617-1617.

LANG M, PRESTELE J, FISCHER C, KOLLMANN J & ALBRECHT H (2016) Reintroduction of rare arable plants by seed transfer. What are the optimal sowing rates? *Ecology and Evolution*, **6** (15), 5506-5516.

LAMBERTO SA, VALLE AF, ARAMAYO EM & ANDRADA AC (1997) Manual ilustrado de las plantas silvestrés de la región de Bahía Blanca. Departamento de Agronomía, Universidad Nacional del Sur. Bahía Blanca, Buenos Aires. 548 pp.

LE PAGE-DEGIVRY MT & GARELLO G (1992) In situ abscisic acid synthesis. A requirement for induction of embryo dormancy in *Helianthus annuus*. *Plant physiology* **98** (4), 1386-1390.

LE PAGE-DEGIVRY MT, BARTHE P & GARELLO G (1990) Involvement of endogenous abscisic acid in onset and release of *Helianthus annuus* embryo dormancy. *Plant physiology* **92** (4), 1164-1168.

LEIDOLF A & MCDANIEL S (1998) A Floristic Study of Black Prairie Plant Communities at Sixteen Section Prairie, Oktibbeha County, Mississippi. *Castanea* **63** (1), 51-62.

LEISHMAN MR (2001) Does the seed size/number trade-off model determine plant community structure? An assessment of the model mechanisms and their generality. *Oikos* **93** (2), 294-302.

LEISHMAN MR, WRIGHT IJ, MOLES AT & WESTOBY M (2000) The Evolutionary of Seed Size. En *Seeds: the ecology of regeneration in plant communities* (Ed. FENNER M), 59-84. CABI Publishing, 10 E 40th Street, Suite 3230, New York, United States.

LEUBNER-METZGER G, FRÜNDT C & MEINS F (1996) Effects of gibberellins, darkness and osmotica on endosperm rupture and class I β -1, 3-glucanase induction in tobacco seed germination. *Planta* **199** (2), 282-288.

LONGÁS MM, CHANTRE GR & SABBATINI MR (2016) Soil nitrogen fertilization as a maternal effect on *Buglossoides arvensis* seed germinability. *Weed Research* **56** (6), 462-469.

LÓPEZ PULIDO M, MEDINA BERMUDEZ JL & FERNANDEZ LÓPEZ C (1988). Boraginaceas de la Provincia de Jaen. *Blancoana* **6**, 3-12.

LORITE J, SALAZAR C & VALLE F (2002) Floristic Check-list of Almeriensian Sierra Nevada (Almería, Spain). I. *Acta Granatense* 1(1-2), 111-138.

LUQUE T & DIAZ LIFANTE Z (1991) Chromosome numbers of plants collected during Iter Mediterraneum I in the SE of Spain. *Bocconea* **1** (1), 303-364.

LUZURIAGA AL, ESCUDERO A & PÉREZ-GARCÍA F (2006) Environmental maternal effects on seed morphology and germination in *Sinapis arvensis* (Cruciferae). *Weed Research* **46** (2), 163-174.

MACOVEI A, PAGANO A, LEONETTI P, CARBONERA D, BALESTRAZZI A& ARAÚJO SS (2016) Systems biology and genome-wide approaches to unveil the molecular players involved in the pre-germinative metabolism: implications on seed technology traits. *Plant Cell Reports* 1-20.

MAHN E-G (1988) Changes in the structure of weed communities affected by agro chemicals: what role does nitrogen play? *Ecological Bulletins* **39**, 71-73.

MANTHEY M, WICHTMANN W, LITTERSKI B & HAMPICKE U (2006) Das EASE-Projektökonomische und ökologische Bewertungextensiver Ackerbauverfahren auf ertragsschwachen Sandstandorten. In: *Proceedings Möglichkeiten und Grenzen der Ökologisierung der* Landwirtschaft (Wolfgang Büchs), 41-49. Biologischen Bundesanstaltfür Land- und Forstwirtschaft Berlin und Braúnschweig, Germany.

MARZOCCA A, MARSICO OJ & DEL PUERTO O (1993) Manual de malezas. (Editorial Hemisferio Sur). 4th edn. Buenos aires, Argentina.

MASUELI RW & MARFIL CF (2010) Epigenética y Evolución. En: *Biotecnologia y Mejoramiento vegetal II* (eds. LEVITUS G, ECHENIQUE V, RUBINSTEIN C, HOPP E & MROGINSKI L). *Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria, Argentina*.

MAZER SJ & WOLFE LM (1992) Planting density influences the expression of genetic variation in seed mass in wild radish (*Raphanus sativus* L.: Brassicaceae). *American Journal of Botany* **79** (10), 1185-1193.

METZGER JD (1983) Role of endogenous plant growth regulators in seed dormancy of *Avena fatua* II. Gibberellins. *Plant physiology* **73** (3), 791-795.

MEYER S & MAHN EG (2006) Untersuchungenzu Struktur und Erhalt der Segetalvegetationimöstlichen Teil der "Karstlandschaf tSüdharz" (Sachsen-Anhalt). *Hercynia* **39**, 247-267.

MIAO SL, BAZZAZ FA & PRIMACK RB (1991) Persistence of maternal nutrient effects in *Plantago major*: the third generation. *Ecology* **72** (5), 1634-1642.

MILANOVA S, BAEVA G, NAKOVA R, MANEVA S, CHAVDAROV L, STOIMENOVA G, & VELICHKOVA T (2007) Some changes and trends in the weed communities in last years in Sofia region. In *Proceeding of the 9-th Symposium of flora of Southeastern Serbia and Neighbouring* (1-3 September, Nis, Serbia). 55-58. Nis, Serbia.

MILBERG P, ANDERSSON L, ELFVERSON C & REGNÉR S (1996) Germination characteristics of seeds differing in mass. *Seed Science Research* **6**, 191-197.

MIKHAILOVA SI, BABENKO AS, NUZHNYH SA, SUCHKOVA SA & ASTAFUROVA TP (2015). Weed Plants of Oilseed Rape Agrocoenoses in Tomsk Oblast. *Biosciences Biotechnology Research Asia* **12** (3), 2273-2278.

MORELLI G & RUBERTI I (2000) Shade avoidance responses. Driving auxin along lateral routes. *Plant Physiology* **122** (3), 621-626.

MULLER-LANDAU HC (2010) The tolerance-fecundity trade-off and the maintenance of diversity in seed size. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **107** (9), 4242-4247.

MUNIR J, DORN LA, DONOHUE K & SCHMITT J (2001) The effect of maternal photoperiod on seasonal dormancy in *Arabidopsis thaliana* (Brassicaceae). *American Journal of Botany* **88** (7), 1240-1249.

MURDOCH AJ & ELLIS RH (2000) Dormancy, Viability and Longevity. En *Seeds: the ecology of regeneration in plant communities* (Ed. M FENNER), 183-214. CABI Publishing, 10 E 40th Street, Suite 3230, New York, United States.

NAMBARA E, AKAZAWA T & MCCOURT P (1991) Effects of the gibberellin biosynthetic inhibitor uniconazol on mutants of *Arabidopsis*. *Plant Physiolog*, **97** (2), 736-738.

NASIR ZA & SULTAN S (2002) Floristic, Biological and Leaf Size Spectra of Weeds in Gram, Lentil, Mustard and Wheat Fields of District Chakwal, Pakistan. *Pakistan Journal of Biological Sciences* **5** (7), 758-762.

NEHVI FA, WANI SA, DAR SA, MAKHDOOMI MI, ALLIE BA & MIR ZA (2006) New emerging trends on production technology of saffron. In *II International Symposium on Saffron Biology and Technology* **739**, 375-381.

NI BR & BRADFORD KJ (1992) Quantitative models characterizing seed germination responses to abscisic acid and osmoticum. *Plant Physiology* **98** (3), 1057-1068.

OGAWA M, HANADA A, YAMAUCHI Y, KUWAHARA A, KAMIYA Y & YAMAGUCHI S (2003) Gibberellin biosynthesis and response during *Arabidopsis* seed germination. *The Plant Cell* **15** (7), 1591-1604.

OLIVIER FC & ANNANDALE JG (1998) Thermal time requirements for the development of green pea (*Pisum sativum* L.). *Field Crops Research* **56** (3), 301-307.

PARMOON G, MOOSAVI SA, AKBARI H & EBADI A (2015) Quantifying cardinal temperatures and thermal time required for germination of *Silybum marianum* seed. *The Crop Journal* **3** (2), 145-151.

PETERS K, BÜRGER J & GEROWITT B (2015) Seltene Ackerwildkräuter im Klimawandel – Ergebnisse von Semifeldversuchen und Artverbreitungsmodellierung von *Lithospermum arvense* und *Scandix pecten-veneris. Biodiversit¨at und Klima - Vernetzung der Akteure in Deutschland XI. BfN-Skripten* **389**: 50-56.

http://www.bfn.de/fileadmin/BfN/service/Dokumente/skripten/skript389.pdf.

PETERS K & GEROWITT B (2014) Response of two rare arable weed species *Lithospermum* arvense and *Scandixpecten-veneris*to climate change conditions. *Plant ecology* **215** (9), 1013-1023.

PETERS NCB (1982a) The dormancy of wild oat seed (*Avena fatua* L.) from plants grown under various temperature and soil moisture conditions. *Weed Research* **22** (4), 205-212.

PETERS NCB (1982b) Production and dormancy of wild oat (*Avena fatua*) seed from plants grown under soil waterstress. *Annals of Applied Biology* **100** (1), 189-196.

PIGLIUCCI M, WHITTON J & SCHLICHTING CD (1995) Reaction norms of *Arabidopsis*. I. Plasticity of characters and correlations across water, nutrient and light gradients. *Journal of Evolutionary Biology* **8** (4), 421-438.

PIZZORNO L, BATLLA D & LÓPEZ PEREIRA M (2012) Effect of maternal environment on sunflower fruit dormancy (*Helianthus annuus*): photoperiod and incident radiation. In: *18th International Sunflower Conference* (27 February- 1 March, Mar del Plata, Argentina).

REEVES TG (1981) Weeds of cereal crops - a review. In 6th Australian Weed Conference, Vol. 6 (August, Australia), 37-45.

REID JB, SYMONS GM & ROSS JJ (2005) Regulation of Gibberellin and Brassinosteroid Biosynthesis by Genetic, Environmental and Hormonal Factors. En: *Plant hormones: biosynthesis, signal transduction, action* (ed. PJ DAVID), 179-203. Kluwer Academic Publishers, 3300 AA Dordrecht, The Netherlands.

RETIEF E & VAN WYK AE (2002) The genus *Buglossoides* (Boraginaceae) in southern Africa. *Bothalia* **32** (1), 9-13.

RICHNER NA (2014) Changes in arable weed communities over the last 100 years (Doctoral dissertation).

ROACH DA & WULFF RD (1987) Maternal effects in plants. *Annual review of ecology and systematics* **18** (1), 209-235.

RYDRYCH DJ & WHITSON TD (1984) Herbicides for annual weed control in eastern Oregon wheat. *Corvallis, Or.: Extension Service*, Oregon State University, United States.

SÁNCHEZ RA, EYHERABIDE G & MIGUEL LD (1981) The influence of irradiance and water deficit during fruit development on seed dormancy in *Datura ferox* L. *Weed Research* **21** (3-4), 127-132.

SANZ JMH (1988) Flora y vegetación de los sabinares de Albacete. *Al-Basit: Revista de estudios albacetenses* **24**, 97-122.

SCHAAL BA (1980) Reproductive capacity and seed size in *Lupinus texensis*. *American Journal of Botany* **67** (5), 703-709.

SCHMID B & DOLT C (1994) Effects of maternal and paternal environment and genotype on offspring phenotype in *Solidago altissima* L. *Evolution* **48** (5), 1525-1549.

SCHMITT J & WULFF RD (1993) Light spectral quality, phytochrome and plant competition. *Trends in Ecology & Evolution* **8** (2), 47-51. SCHMUTHS H, BACHMANN K, WEBER WE, HORRES R & HOFFMANN MH (2006) Effects of preconditioning and temperature during germination of 73 natural accessions of *Arabidopsis thaliana*. *Annals of Botany* **97**, 623-634.

SCHOPFER P, BAJRACHARYA D & PLACHY C (1979) Control of seed germination by abscisic acid I. Time course of action in *Sinapis alba* L. *Plant Physiology* **64** (5), 822-827.

SCHWINNING S & SALA OE (2004) Hierarchy of responses to resource pulses in arid and semi-arid ecosystems. *Oecologia* **141** (2), 211-220.

SCURSONI JA, GIGÓN R, MARTÍN AN, VIGNA M, LEGUIZAMÓN ES, ISTILART C & LÓPEZ R (2014) Changes in weed communities of spring wheat crops of Buenos Aires province of Argentina. *Weed Science* 1 (62), 51-62.

SEIDEL JE & RUSSELL KW (1990) Pyridate - a new selective broad-leaved herbicide for post-emergence use in chickpeas. In *Proceedings of the Ninth Australian Weeds Conference* (6-10 August, Adelaide, South Australia). 339-342. *Plant hormones: biosynthesis, signal transduction, action* (ed. PJ DAVID) Kluwer Academic Publishers, 3300 AA Dordrecht, The Netherlands.

SMITH H (1982). Light quality, photoperception, and plant strategy. *Annual review of plant physiology* **33** (1), 481-518.

SMITH H & WHITELAM GC (1997) The shade avoidance syndrome: multiple responses mediated by multiple phytochromes. *Plant, Cell and Environment* **20**, 840-844.

SONG WJ, ZHOU WJ, JIN DZL, ZHANG D, YONEYAMA K, TAKEUCHI Y & JOEL DM (2006) Growth regulators restore germination of *Orobanche* seeds that are conditioned under water stress and suboptimal temperature. *Australian Journal of Agricultural Research* 57, 1195–1201.

STANTON ML (1985) Seed size and emergence time within a stand of wild radish (*Raphanus raphanistrum* L.): the establishment of a fitness hierarchy. *Oecologia* **67** (4), 524-531.

STANTON ML (1984) Seed variation in wild radish: effect of seed size on components of seedling and adult fitness. *Ecology* **65** (4), 1105-1112.

STEADMAN KJ, ELLERY AJ, CHAPMAN R, MOORE A & TURNER NC (2004) Maturation temperature and rainfall influence seed dormancy characteristics of annual ryegrass (*Lolium rigidum*). *Crop and Pasture Science* **55** (10), 1047-1057.

STEADMAN KJ & PRITCHARD HW (2003) Germination of *Aesculus hippocastanum* seeds following cold-induced dormancy loss can be described in relation to a temperature-dependent reduction in base temperature (Tb) and thermal time. *New Phytologist* **161**, 415-425.

STEINBACH HS, BENECH-ARNOLD RL & SANCHEZ RA (1997) Hormonal regulation of dormancy in developing sorghum seeds. *Plant Physiology* **113** (1), 149-154.

STEINMAUS SJ, PRATHER TS & HOLT JS (2000) Estimation of base temperatures for nine weed species. *Journal of Experimental Botany* **51** (343), 275-286.

STOLTON S & GEIER B (2002) The relationship between biodiversity and organic agriculture. In *High-level Pan-European Conference on Agriculture and Biodiversity: towards integrating biological and landscape diversity for sustainable agriculture in Europe. Maison de l'Unesco-Paris-France-5-7 June.*

SULTAN SE (2003) Phenotypic plasticity in plants: a case study in ecological development. *Evolution & Development* **5** (1), 25-33.

SULTAN SE (2001) Phenotypic plasticity for fitness components in *Polygonum* species of contrasting ecological breadth. *Ecology* **82** (2), 328-343.

SULTAN SE (2000) Phenotypic plasticity for plant development, function and life history. *Trends in plant science* **5** (12), 537-542.

SULTAN S (1996) Phenotypic plasticity for offspring traits in *Polygonum persicaria*. *Ecology* **77** (6), 1791-1807.

TAFRA D, PANDŽA & MILOVIĆ (2012) Vascular flora of the Town of Omiš. *Nat. Croat.* **21** (2), 301-334.

TOCHER DR, FRANCIS DS & COUPLAND K (2010) n-3 Polyunsaturated fatty acid-rich vegetable oils and blends. In *Fish oil replacement and alternative lipid sources in aquaculture feeds* (TURCHINI GM, NG W-K & TOCHER DR) 209-244. CRC Press, Taylor & Francis Group, Boca Ratón, Florida, United States.

TAYLOR JS & SIMPSON GM (1980) Endogenous hormones in after-ripening wild oat (*Avena fatua*) seed. *Canadian Journal of Botany* **58** (9), 1016-1024.

THODAY JM (1953) Components of fitness. In *Symposia of the Society for Experimental Biology*, **7** (9), 95-113. Great Britain.

THOMAS JF & RAPER CD (1979) Germinability of tobacco seed as affected by culture of the mother plant. *Agronomy Journal* **71**, 694-695.

TRUDGILL DL, HONEK A, LI D & VAN STRAALEN NM (2005) Thermal time – concepts and utility. *Annals of Applied Biology* **146**, 1-14.

VAN HINSBERG A (1998) Maternal and ambient environmental effects of light on germination in *Plantago lanceolata*: correlated responses to selection on leaf length. *Functional Ecology* **12**, 825-833.

VAUGHTON G & RAMSEY M (1998). Sources and consequences of seed mass variation in *Banksia marginata* (Proteaceae). *Journal of Ecology* **86** (4), 563-573.

VIDAVER W & HSIAO AH (1974) Actions of gibberellic acid and phytochrome on the germination of Grand Rapids lettuce seeds. *Plant physiology* **53** (2), 266-268.

WASHITANI J (1987) A convenient screening test system and a model for thermal germination responses of wild plant seeds: behaviour of model and real seeds in the system. *Plant, Cell and Environment* **10**, 587-598.

WASHITANI I & TAKENAKA A (1984) Mathematical description of the seed germination dependency on time and temperature. *Plant, Cell & Environment* **7** (5), 359-362.

WEIGEND M & ÁLVAREZ M (2014) Distribution of *Buglossoides arvensis* (L.) I.M. Johnst. (Boraginaceae) in South America: new records for the floras of Chile, Bolivia, Peru and Colombia. *Gayana Bot.* **71** (1), 167-170.

WEIJSCHEDÉ J, MARTÍNKOVÁ J, DE KROON H & HUBER H (2006) Shade avoidance in *Trifolium repens*: costs and benefits of plasticity in petiole length and leaf size. *New Phytologist* **172** (4), 655-666.

WEINIG C (2000a) Plasticity versus canalization: population differences in the timing of shade-avoidance responses. *Evolution* **54** (2), 441-451.

WEINIG C (2000b) Limits to adaptive plasticity: temperature and photoperiod influence shade-avoidance responses. *American Journal of Botany* **87** (11), 1660-1668.

WELLER SG (1985) Establishment of *Lithospermum caroliniense* on sand dunes: the role of nutlet mass. *Ecology* **66** (6), 1893-1901.

WINN AA (1988) Ecological and evolutionary consequences of seed size in *Prunella vulgaris*. *Ecology* **69** (5), 1537-1544.

VLEESHOUWERS LM, BOUWMEESTER HJ & KARSSEN CM (1995) Redefining seed dormancy: an attempt to integrate physiology and ecology. *Journal of Ecology* **83**, 1031-1037.

WOLF LL, HAINSWORTH FR, MERCIER T & BENJAMIN R (1986) Seed size variation and pollinator uncertainty in *Ipomopsis aggregata* (Polemoniaceae). *The Journal of Ecology* **74**, 361-371.

WOŹNIAK A & SOROKA M (2015) Biodiversity of weeds in pea cultivated in various tillage system. *Romanian Agricultural Research* **32**, 231-237.

WOŹNIAK A (2012) Weed infestation of pea (*Pisum sativum* L.) crop under the conditions of plough and ploughless tillage. *Acta Sci. Pol.—Hortorum Cultus* **11** (2), 253-262.

WRIGHT KJ, SEAVERS GP, PETERS NCB & MARSHALL MA (1999) Influence of soil moisture on the competitive ability and seed dormancy of *Sinapis arvensis* in spring wheat. *Weed Research* **39** (4), 309-317.

WRIGHT LN (1971) Drought influence on germination and seedling emergence. *Drought injury and resistance in crops* (droughtinjuryan), 19-44.

WULFF RD (1995) Environmental Maternal Effects on Seed Quality and Germination. En: *Seed development and germination* (eds. J KIGEL &G GALILI), 491-505. CRC press, 270 Madison Avenue, New York, United States.

WULFF RD (1986a) Seed size variation in *Desmodium paniculatum*: I. Factors affecting seed size. *The Journal of Ecology* **74** (1) 87-97.

WULFF RD (1986b) Seed size variation in *Desmodium paniculatum*: II. Effects on seedling growth and physiological performance. *The Journal of Ecology* **74** (1), 99-114.

WULFF RD (1986c). Seed size variation in *Desmodium Paniculatum*: III. Effects on reproductive yield and competitive ability. *The Journal of Ecology* **74** (1) 115-121.

YOSHIOKA T, ENDO T & SATOH S (1998) Restoration of seed germination at supraoptimal temperatures by fluridone, an inhibitor of abscisic acid biosynthesis. *Plant and Cell Physiology* **39** (3), 307-312.

ZIPPEL E & WILHALM T (2003) Nachweis und Verbreitungannueller *Buglossoides*-Arten (Lithospermeae, Boraginaceae) in Südtirol (Italien). *Gredleriana* **3**, 347-360.

Páginas de internet

- 1. http://www.tankonyvtar.hu/hu/tartalom/tamop425/2011_0001_521_Gyomnovenyek_gy omirtas/ch01s05.html
- 2. http://www2.darwin.edu.ar/proyectos/floraargentina/fa.htm
- **3.** http://rian.inta.gov.ar/atlasmalezas/atlasmalezasportal/DetalleMaleza.aspx?pagante=CX F&idmaleza=22023
- **4.** www.weedscience.org, http://weedscience.org/details/case.aspx?ResistID=5612.
- 5. https://www.ajbbahia.com/ajb/%C3%A1mbito-de-la-departamental/
- **6.** http://www.elistas.net/lista/encuentrohumboldt/archivo/indice/2474/msg/2548/).
- 7. https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/1/19/Bahia_Blanca_Buenos_Aires.pn g)

ANEXO I: CAPÍTULO I

AKPULAT HA & ÇELİK N (2002) Sivas-Sıcak Çermik Arası Florası. Fen Bilimleri Dergisi, 23 (1).

AL-GHARAIBEH MM (2005) An ecosystematic study of a semi-arid ecotone in the northern part of Jordan (Doctoral dissertation, Yarmouk University).

ARNI A & MATEVSKI V (2005) Comparison of short-lived ruderal vegetation of the inland and coastal regions in the southern part of the Balkan Peninsula. *Fitosociologia* **42**, 97-107.

AULD B, MORITA H, NISHIDA T, ITO M & MICHAEL P (2003). Shared exotica: plant invasions of Japan and south eastern Australia. *Cunninghamia* **8** (1), 147-152.

BAESSLER C & KLOTZ S (2006) Effects of changes in agricultural land-use on landscape structure and arable weed vegetation over the last 50 years. *Agriculture, ecosystems & environment* **115** (1), 43-50.

BARANOSKI B, KHROMYKH N, KARMYZOVA L, IVANKO I, & LYKHOLAT Y (2016) Analysis of the alien flora of Dnipropetrovsk Province. *Biological Bulletin of Bogdan Chmelnitskiy Melitopol State Pedagogical University* **6** (3), 419-429.

BERTUZZI, T (2013) Florística de ecossistemas aquáticos temporários na região de Pelotas, Rio grande do Sul, Brasil. Dissertação de mestrado, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, Brasil.

BOGOSAVLJEVIĆ S, ZLATKOVIĆ B & RANĐELOVIĆ V (2007). Flora klisure Svrljiškog Timoka. In: *Proceeding of 9th Symposium on the Flora of southeastern Serbia and Surrounding Regions* (1-3 September, Niš, Serbia). 41-54. Niš, Serbia.

BOWEN B, JOHNSON C, FRANKLIN S, CALL G & WEBBER M (2002) Invasive exotic pest plant in Tennessee. *Journal of the Tennessee Academy of Science* **77** (2), 45-48.

BUCKLEY R (1981) Alien plants in central Australia. *Botanical journal of the Linnean Society* **82** (4), 369-379.

BÜKÜN B (2004) The weed flora of winter wheat in Sanliurfa, Turkey. *Pakistan Journal of Biological Sciences (Pakistan)* **7** (9),1530-1534.

CZARNA A (2001) Wystepowanie *Omphalodes scorpioides* [Haenke] Schrank w Wielkopolsce. *Roczniki Akademii Rolniczej w Poznaniu. Botanika* **4**, 39-52.

CARPENTER D & CAPPUCCINO N (2005) Herbivory, time since introduction and the invasiveness of exotic plants. *Journal of Ecology* **93**, 315-321.

CARR ME, ROTH WB & BAGBY MO (1986) Potential resource materials from Ohio plants. *Economic botany* **40** (4), 434-441.

CARRETERO JL & ESTERAS FJ (1979) Sobre la presencia de *Gamochaeta pensylvanica* (Willd.) Cabrera en España. *An. Inst Bot. AJ Cavanilles* **36**, 407-426.

CASAFE (2015) Guía de productos fitosanitarios de la República Argentina. 17° edición, Buenos Aires, Argentina, CASAFE, 1571 pp.

CEPPI H (1994) La flore du Mont de Chamblon. *Bulletin du Cercle vaudois de botanique* **23**, 53-60.

https://doc.rero.ch/record/27624/files/23-09.pdf

CHANTRE GR, SABBATINI MR & ORIOLI G (2009a) Effect of burial depth and soil water regime on the fate of *Lithospermum arvense* seeds in relation to burial time. *Weed Research* **49**, 81-89.

DAL CERO M, SALLER R & WECKERLE CS (2014) The use of the local flora in Switzerland: A comparison of past and recent medicinal plant knowledge. *Journal of ethnopharmacology* **151** (1), 253-264.

http://eskidergi.cumhuriyet.edu.tr/makale/7.pdf

DIAMOND JR AR (2003) A checklist of the vascular flora of Pike County, Alabama. *Castanea*, 143-159.

EKMAN J & EKMAN G (1997) Bidrag till Roslagens flora. Daphne 8 (1-2), 32-43.

FANG R C & STAPLES G (1995). Flora of China, Vol. 16. 271-325. Beijing: Science Press, Beijing, China.

http://www.efloras.org/florataxon.aspx?flora_id=2&taxon_id=200019085

GARRETT AO (1913) Some introduced plants of Salt Lake County, Utah. *Torrey Botanical Society* **13** (10), 237-241.

GAVRILOVA G, LAIVIŅŠ M, PRIEDE A & MEDENE A (2011) Alien flora in the Lake Engure Nature Park. *Proceedings of the Latvian Academy of Sciences. Section B. Natural, Exact, and Applied Sciences* **65** (5-6), 154-163.

GERASIMIDIS A & KORAKIS G (2009) Contribution to the study of the flora of Mount Mitsikeli, NW Greece. *Fl Medit* **19**, 161-184.

GJETA E, ZOTAJ A, MULLAJ A, NAQELLARI P & PUPULEKU B (2013) Types of natural habitats in Shebenik-Jabllanica national park. *Albanian Journal of Agricultural Sciences* **12** (4), 593-597.

HANSON CG & MASON JL (1985) Bird seed aliens in Britain. Watsonia, 15 (3), 237-252.

HOAGLAND BW & BUTHOD A (2005) Vascular flora of a site along the Arkansas River, Pawnee County, Oklahoma. *Oklahoma Native Plant Record* **5** (1).

HRONEŠ M. (2015) Notes on the adventive flora of northern Moravia and Silesia 4. *Buglossoides* arvensis and B. incrassata subsp. splitgerberi. *Acta Mus. Beskid* 7, 23-37.

HULINA N (2005) List of threatened weeds in the continental part of Croatia and their possible conservation. *Agriculturae Conspectus Scientificus (ACS)* **70**(2), 37-42.

ISSOLAH R, BELOUED A. & YAHIAOUI S (2011) Preliminary inventory of the species associated to *Sulla coronaria* (L.) Medik. (Fabaceae) in Northeastern Algeria. *Pakistan Journal of Weed Science Research* **17**(1).

JAFARI SM & AKHANI H (2008) Plants of Jahan Nama Protected Area, Golestan Province, N. Iran. *Pakistan Journal of Botany* **40**(4), 1533-1554.

JANG J, CHANG KS, PARK SH, JI SJ, LEE HJ, BYEON JG, HWANG HS & MI LEE Y (2013) Floristic study of Gogunsan Archipelago, Jeollabuk-do, Korea. *Journal of Asia-Pacific Biodiversity* 6 (4), 467-484.

JIN-SHUANG MA (2010) Nomenclatural Notes on Alien Vascular Plants in North America Originated from East Asia. *Acta Botanica Yunnanica*, 32 (1), 14-24.

JURY SL, RUTHERFORD RW, REJDALI M, RANKOU H & EL ATECHI T (2008) The vascular flora of Oukaïmeden, in the Moroccan High Atlas. 2nd eds.

KAMP I, HOLZEL N, KUHLING I & KIEHL K (2016) Populationsdynamik und Biodiversitat. In: *Proceedings Deutsche Arbeitsbesprechung uber Fragen der Unkrautbiologie und -bekampfung* (23-25 February, Braúnschweig, Alemania). 76-83. Braúnschweig, Alemania.

KONCZ P, BESNYŐI V, CSATHÓ AI, NAGY J, SZERDAHELYI T, TÓTH ZS, PINTÉR K, BALOGH J, NAGY Z & BARTHA S (2014). Effect of grazing and mowing on the microcoenological composition of a semi-arid grassland in Hungary. *Appl. Ecol. Environ. Res* 12, 563-575.

LANG M, TRUFFEL C, PRESTELE J, WIESINGER K, KOLLMANN J, & ALBRECHT H (2015) Einfluss von Deckfruchtund Fruchtfolgeauf die Wiederansiedlunggefährdeter Ackerwildpflanzen.13. Wissenschaftstagung Ökologischer Landbau Beitragarchiviertunter (17-20 marzo 2015 Eberswalde, Alemania)

http://orgprints.org/view/projects/int-conf-wita-2015.html

LEUTE GH (1978) Ergebnisse einer botanischen Sammelreise durch das südliche Jugoslawien im Jahre 1969. Annalen des Naturhistorischen Museums in Wien **81** 75-105.

LYCOPSOIDES LEHM A (2014) Checklist of Oregon Boraginaceae.

MAGNIN-GONZE J & VALLADE J (2012) Aperçu de la flore printanière de Bourgogne. *Bulletin du Cercle vaudois de botanique* **41**, 29-42.

MARKUS A (1865) Beiträge zur Kenntniss der Flora von Neusohl. Österreichische botanische Zeitschrift **15**(6), 183-190.

MENNEMA J & HOLVERDA WJ (1980) Nieuwe vondsten van zeldzame planten in Nederland, hoofdzakelijk in 1979. *Gorteria* **10** (5/6), 81-100.

MORALES R (2003) Catálogo de plantas vasculares de la Comunidad de Madrid (España). *Botanica Complutensis* **27**, 31-70.

NOWAK S, NOWAK A, NOBIS M & NOBIS A (2014) Caucalido platycarpi-Vicietum michauxii—a new weed association from crop fields of Kyrgyzstan (Middle Asia). *Central European Journal of Biology* **9** (2), 189-199.

OANA Z (2006) Conspectus Of The Vascular Flora From The Left Side Of The Izvoru Muntelui-Bicaz Reservoir. *Buletinul Grădinii Botanice Iași* **13**, 47-57.

PÉREZ-CHAO JL (2002) Flórula vascular de la sierra de Guillimona (Granada) (Sur de la Península Ibérica). *Blancoana* **19**, 53-79.

PILJAC-KOSOVIĆ L & PANDŽA M (2009) Flora of the island of Vrgada and the surrounding islets. *Natura Croatica* **18** (2), 309-333.

POPOVIĆ Z, SMILJANIĆ M, MATIĆ R, KOSTIĆ M, NIKIĆ P & BOJOVIĆ S (2012). Phytotherapeutical plants from the Deliblato sands (Serbia): traditional pharmacopoeia and implications for conservation. *Indian Journal of traditional Knowledge* **11** (3), 385-400.

PYKÄLÄ J & HEIKKINEN RK (2005) Complementarity-based algorithms for selecting sites to preserve grassland plant species. *Agriculture, ecosystems & environment* **106** (1), 41-48.

RENDEKOVÁ A & MIŠKOVIC J (2014) ZASTÚPENIE NEPÔVODNÝH DRUHOV V RÔZNYCH TYPOCH. ACTA UNIVERSITATIS MATTHIAE BELII Séria Environmentálne Manažérstvo XVI (1), 40-54.

RAIMONDO FM, DOMINA G & SPADARO V (2010) Check list of the vascular flora of Sicily. *Quad.Bot.Amb.Appl.* **21**, 189-252.

RESHI Z, RASHID I, KHUROO AA & WAFAI BA (2008) Effect of invasion by *Centaurea iberica* on community assembly of a mountain grassland of Kashmir Himalaya, India. *Tropical Ecology* **49** (2), 147-156.

RETIEF E & VAN WYK AE (2002) The genus *Buglossoides* (Boraginaceae) in southern Africa. *Bothalia* **32** (1), 9-13.

ROZENFELDS ACF & MACKENZIE R (1999) The weed invasion in Tasmania in the 1870s: knowing the past to predict the future. In *12th Australian weed conference papers and proceedings*, 581-583.

RZYMOWSKA Z, SKRAJNA T, DUNAJKO D & KOŚCIUK K (2015) Zachwaszczenie upraw zbóż na równinie łukowskiej. *Zeszyty Naukowe Uniwersytetu Przyrodniczo-Humanistycznego w Siedlcach. Seria Rolnictwo*, **1** (1), 45-65.

SANZ GM (2009) Flora de la Sierra de Albarracín y su comarca (Teruel), Vol. 2. Fundación Oroibérico (Noguera de Albarracín, Teruel) y José Luis Benito Alonso (Jolube Consultor y Editor Ambiental, Jaca. www.jolube.es), 2nd edn, 40-41. España.

SCHMITZBERGER I, THURNER B & WRBKA T (2010) Melica altissima und Stipa dasyphylla–Populationsmonitoring für zwei floristische Besonderheiten im Nationalpark Thayatal. na. Wiss. Mitt. Niederösterr. Landesmuseum 21, 195-208.

SILIC U & CARNI A (2005) Changes in weed vegetation on extensively managed fields of central Slovenia between 1939 and 2002. *Biologia-Bratislava* **60** (4), 1-8.

STANKOVIĆ J, ZLATKOVIĆ B & RANĐELOVIĆ V (2008) Flora Crvenog Brega kod Gnjilana (Kosovo). *IX Simpozijum o flori jugoistočne Srbije i susednih regiona. Zbornik radova*, 119-126.

STOYANOV S (2005) The vascular flora of the catchment basin of the river Roussenski Lom (Bulgaria) in the beginning of the 21st century. *Fl. Medit* **15**, 351-383.

SULTAN S & NASIR ZA (2003) Dynamics of weed communities in gram fields of Chakwal, Pakistan. *Asian Journal of Plant Sciences* **2** (17-24), 1198-1204.

TAFRA D, PANDŽA & MILOVIĆ (2012) Vascular flora of the Town of Omiš. *Nat. Croat.* **21** (2), 301-334.

TATLI A, AKAN H, TEL AZ & KARA C (2002) The Flora of Upper Ceyhan Valley (Kahramanmaraş/Turkey). *Turkish Journal of Botany* **26**(4), 259-276.

http://journals.tubitak.gov.tr/botany/issues/bot-02-26-4/bot-26-4-7-0011-1.pdf

VALDÉS B (2011) Boraginaceae. In: *Claves de la flora vascular de Andalucía oriental*, Vol. 49. 2nd edn, 1187-1199. Universidades de Almeria, Granada, Jaèn y Màlaga, Granada, España.

VEKUA A & LORDKIPANIDZE D (2011) Evolution of Paleosituation in Georgian Anthropogene. *Bull. Georg. Natl. Acad. Sci* **5** (3), 116-122.

VERLOOVE F & VANDENBERGHE C (1997) Nieuwe en interessante voederadventieven in België en aangrenzend Nederland, hoofdzakelijk in 1996. *Dumortiera* **68**, 13-26.

VLADIMIROV V, DANE F & TAN K (2010) New floristic records in the Balkans: 13. *Phytologia Balcanica* **16** (1), 143-165.

YILMAZ H & TUTTU G (2016) Flora of Çamucu Forest Enterprice area (Balya, Balıkesir/Turkey). *Biological Diversity and Conservation* **9** (1), 10-24.

WEIGEND M & ALVAREZ M (2014). Distribución de *Buglossoides arvensis* (L.) IM Johnst. (Boraginaceae) en Sudamérica: nuevos registros para las floras de Chile, Bolivia, Perú y Colombia. *Gayana. Botánica* **71** (1), 167-170.

ZAHARIEV D (2014) An investigation into the flora of the Shumen Heights. *Phytologia Balcanica*, *Sofia* **20** (1), 79-88.

http://www.bio.bas.bg/~phytolbalcan/PDF/20_1/20_1_09_Zahariev.pdf

БЕЛОУС ВН (2014) Эколого-ценотические особенности степных сообществ долины реки Горькая Балка (Ставропольский край). In *XIII Международная научно-практическая конференция*, 31-36.

Moscow, Russia, from 2017-05-11 to 2017-05-12

ЗАЩЕПКИНЕЕ (2016). Weediness of winter wheat of no-till technology in the zone of unreliable moistening. In: *Proceedings VI Международнаянаучно-практическаяконференция* "применениесовременных ресурсосберегающих инновационных технологийванк"

(Издательство" АГРУС", Ставрополь) (8-12 February, Stavropol, Rusia). 1-7. Ставропольскийгосударственный аграрный университет, Stavropol, Stavropolski ykray, Rusia.

ANEXO II: CAPÍTULO II

- Experimento I

→ 78 días de post maduración

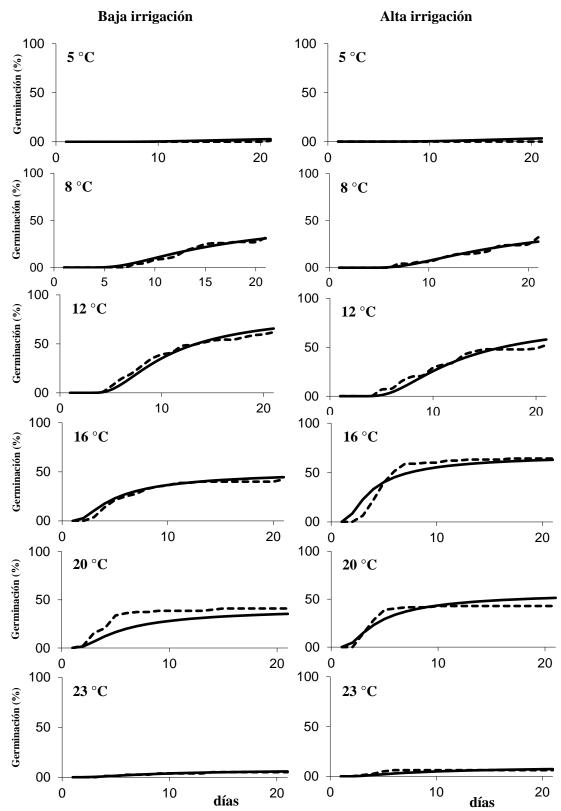


Figura II.I Curvas promedio de germinación acumulada obtenidas experimentalmente (---) y simuladas (——) provenientes de semillas cuyas madres fueron sometidas a baja o alta disponibilidad hídrica. Incubación por 21 días a 5, 8, 12, 16, 20 y 23 °C a 78 días de su cosecha.

→ 136 días de post maduración

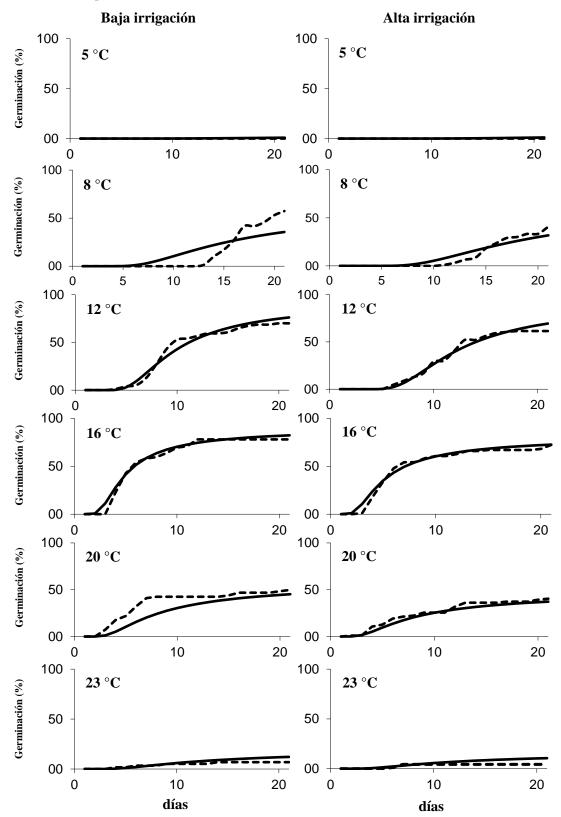


Figura II.II Curvas promedio de germinación acumulada obtenidas experimentalmente (-----) y simuladas (——) provenientes de semillas cuyas madres fueron sometidas a baja o alta disponibilidad hídrica. Incubación por 21 días a 5, 8, 12, 16, 20 y 23 °C a 136 días de su cosecha.

→ 271 días de post maduración

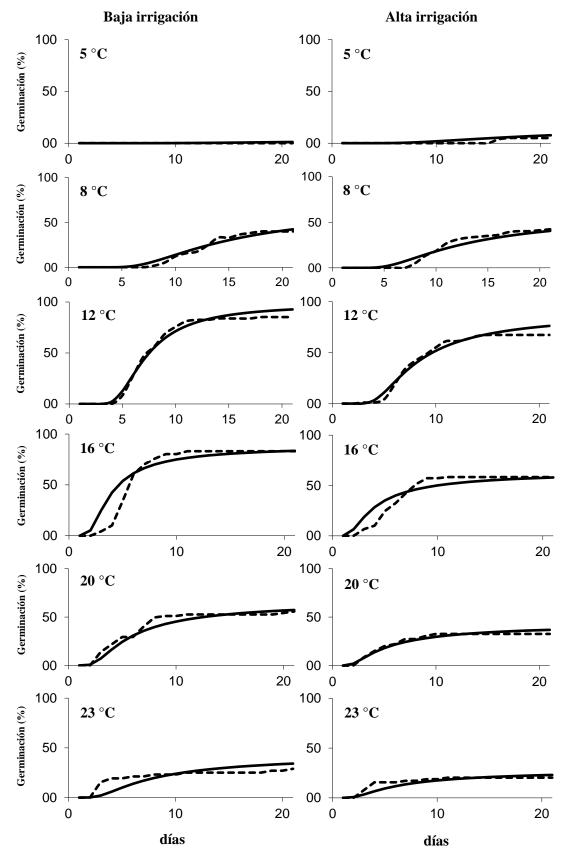


Figura II.III Curvas promedio de germinación acumulada obtenidas experimentalmente (----) y simuladas (——) provenientes de semillas cuyas madres fueron sometidas a baja o alta disponibilidad hídrica. Incubación por 21 días a 5, 8, 12, 16, 20 y 23 °C a 271 días de su cosecha.

→ 359 días de post maduración

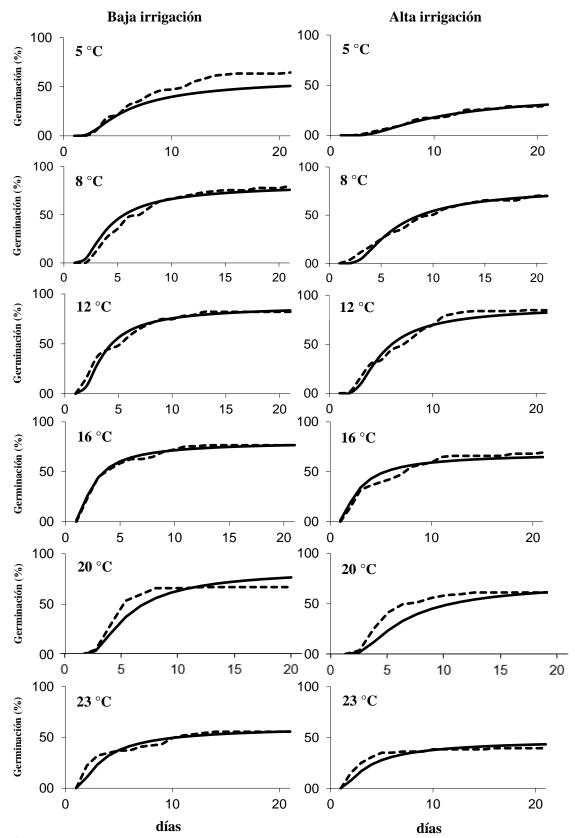
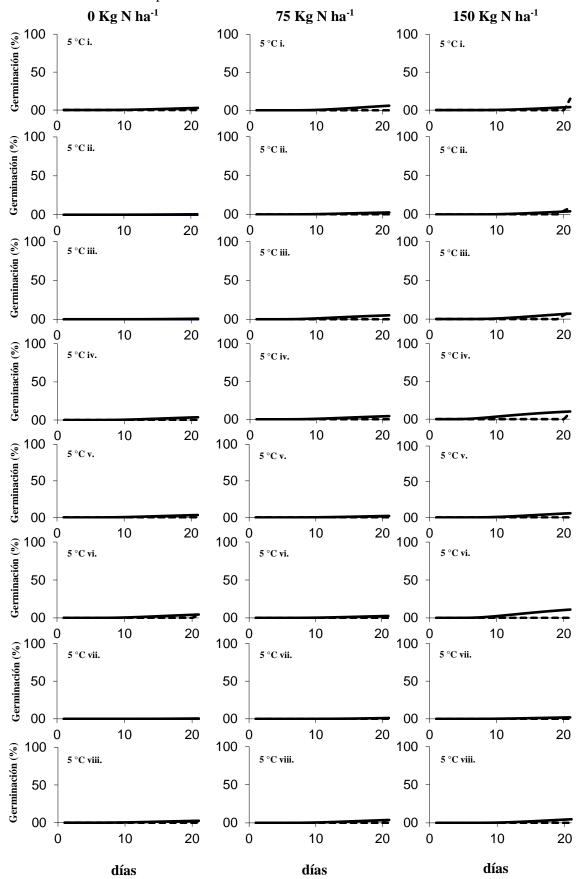
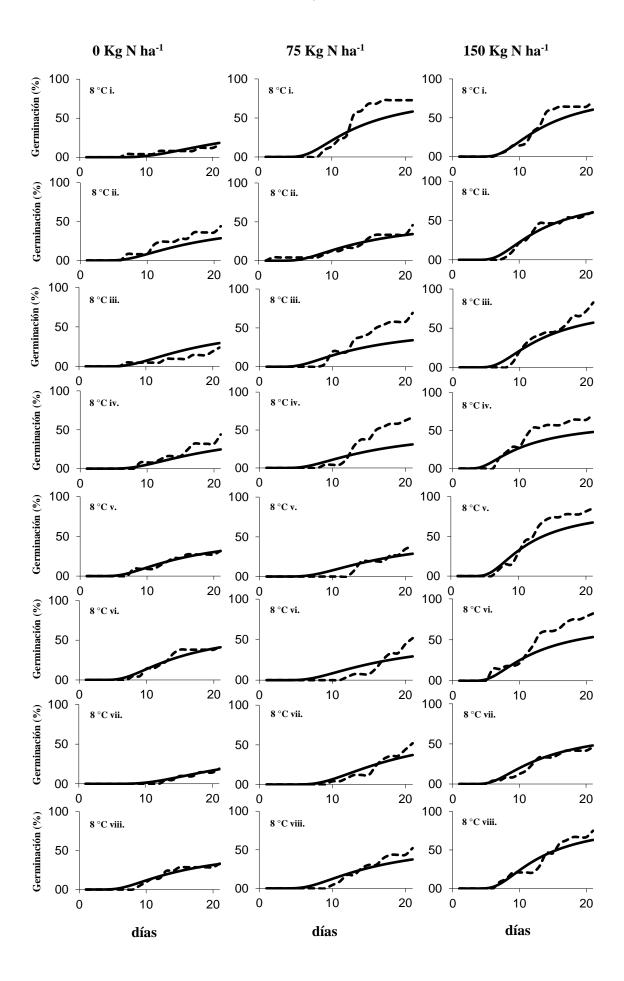


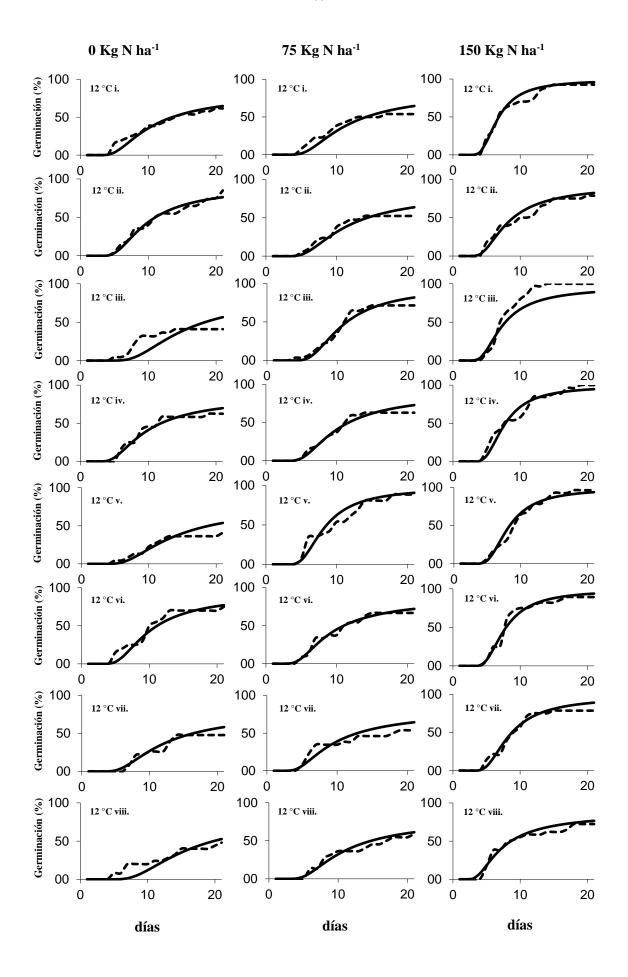
Figura II.VI Curvas promedio de germinación acumulada obtenidas experimentalmente (---) y simuladas (——) provenientes de semillas cuyas madres fueron sometidas a baja o alta disponibilidad hídrica. Incubación por 21 días a 5, 8, 12, 16, 20 y 23 °C a 359 días de su cosecha.

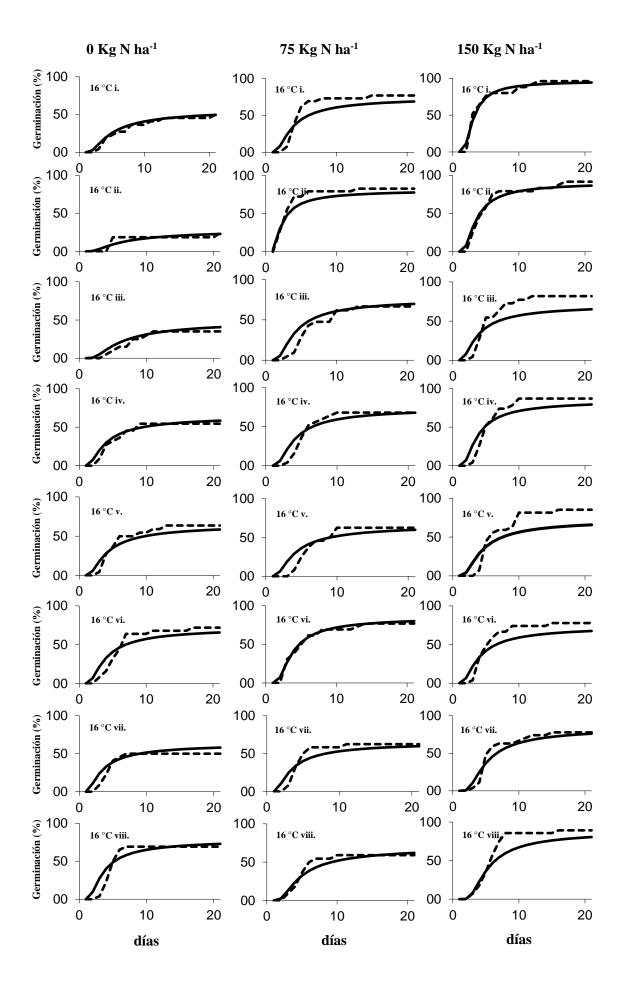
- Experimento II

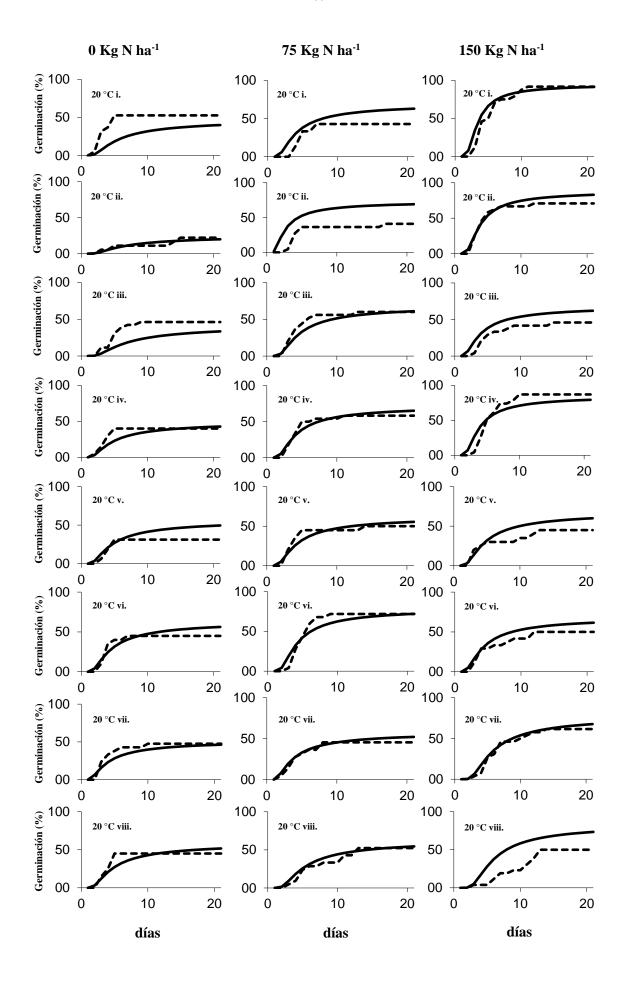
→ 1er año → 90 días de post-maduración

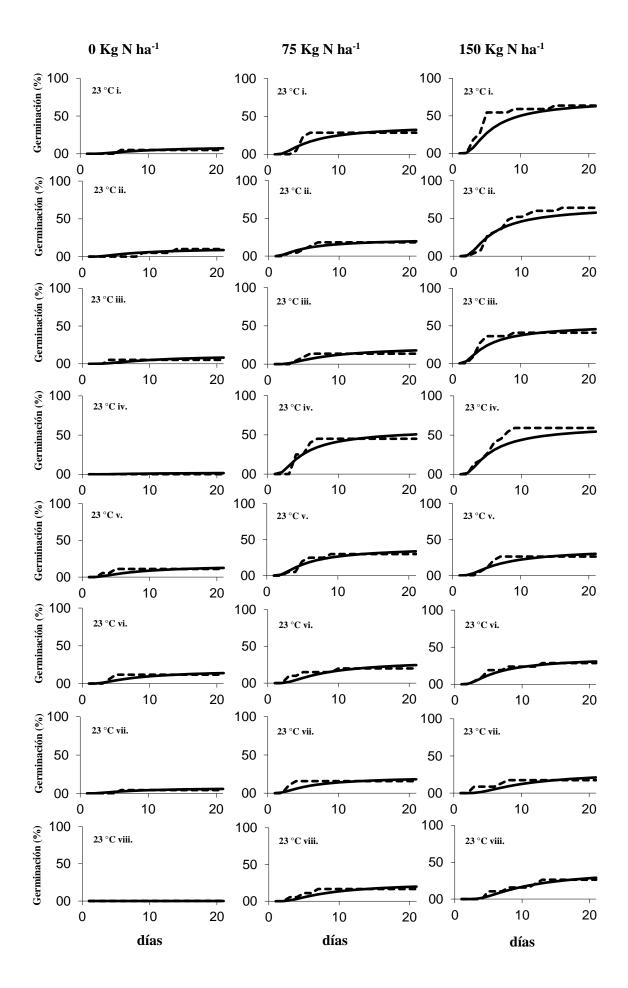


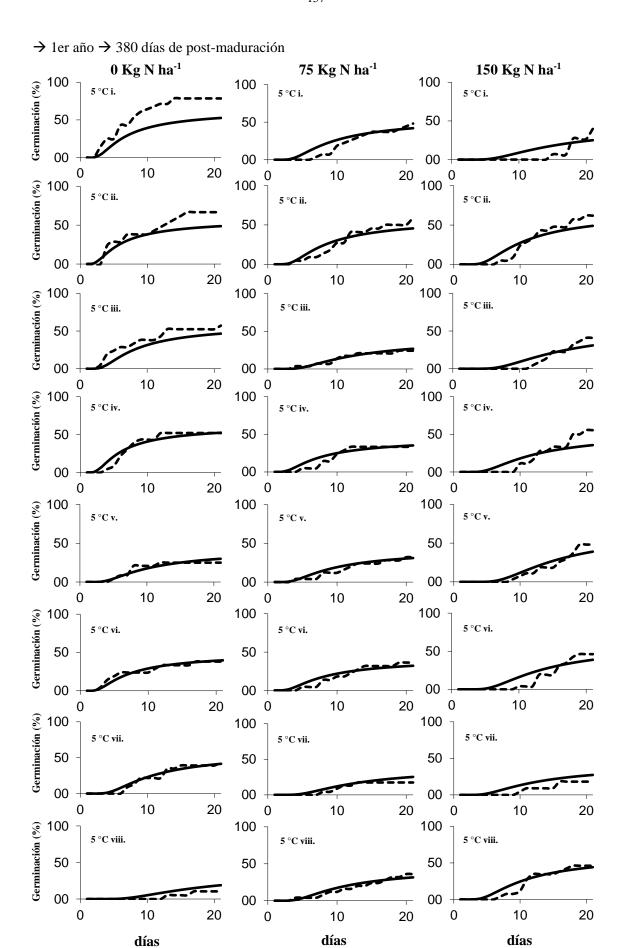


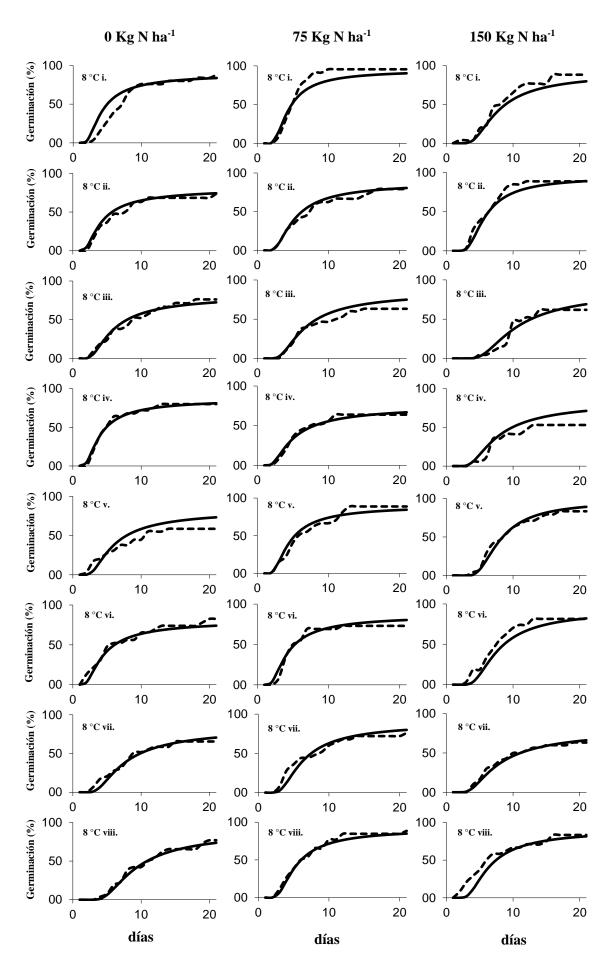


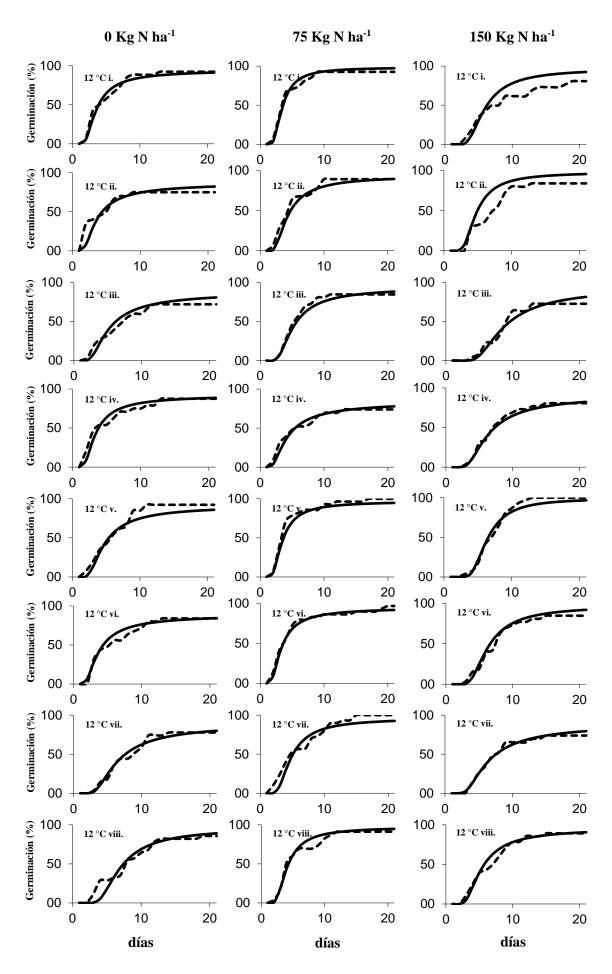


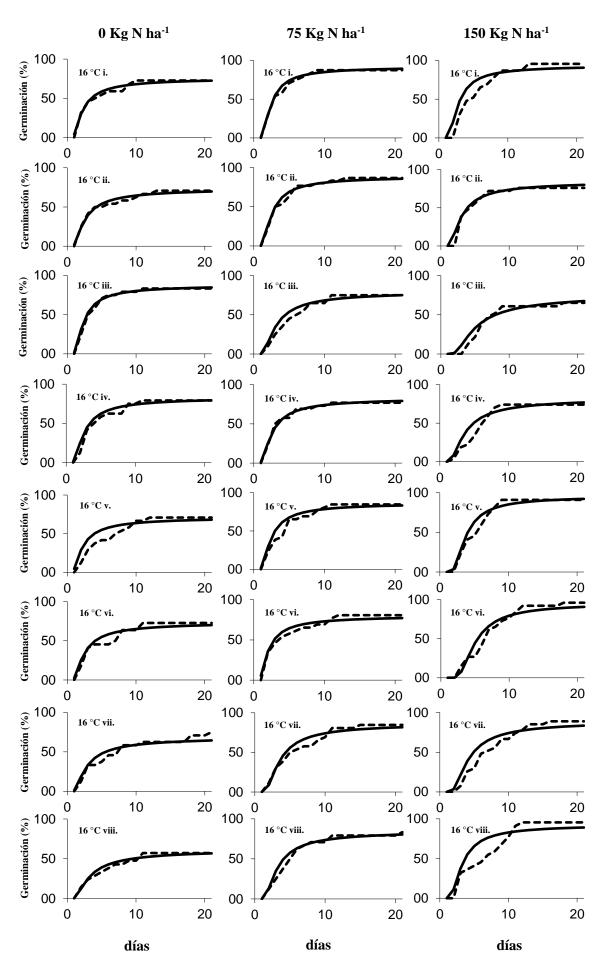


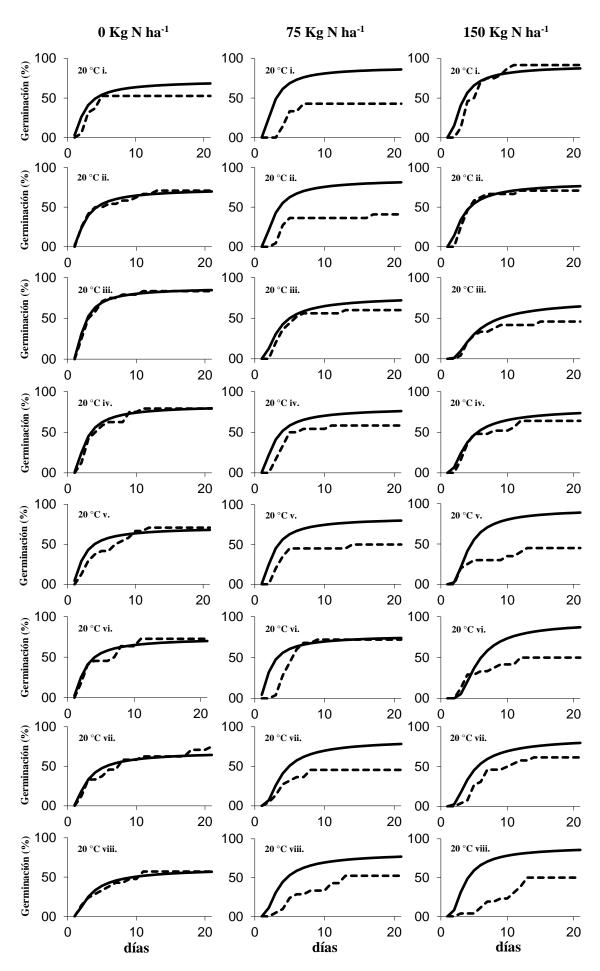


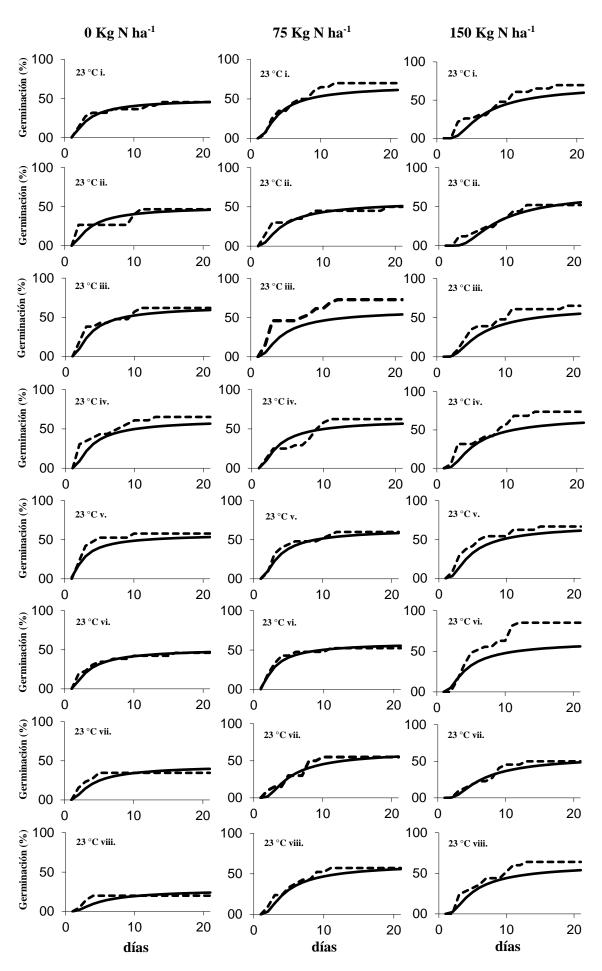


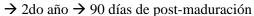


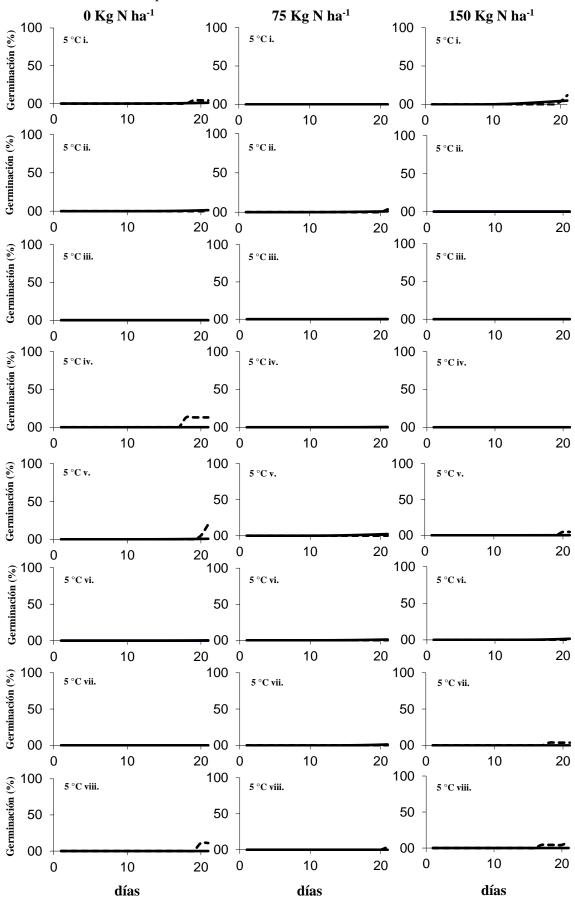


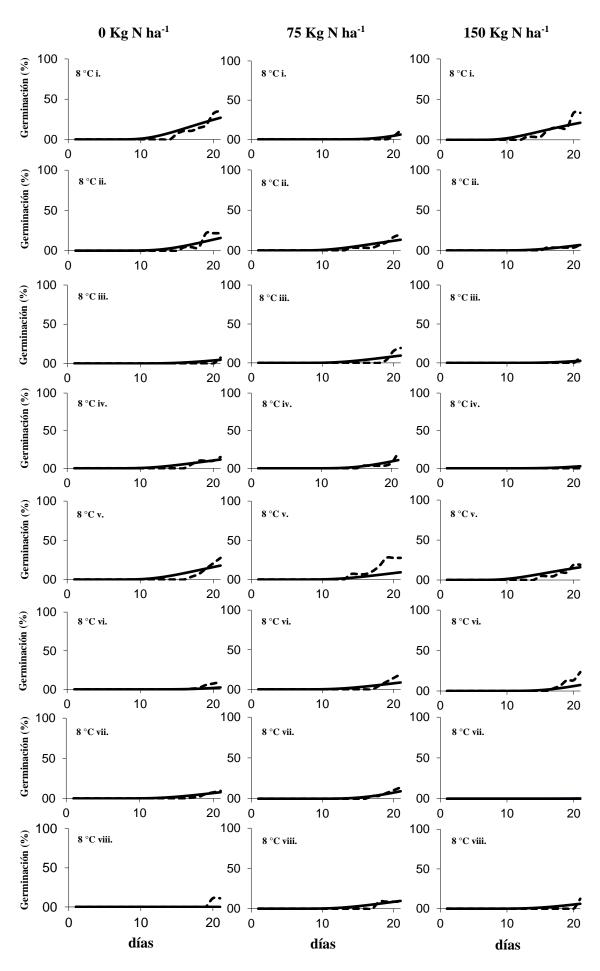


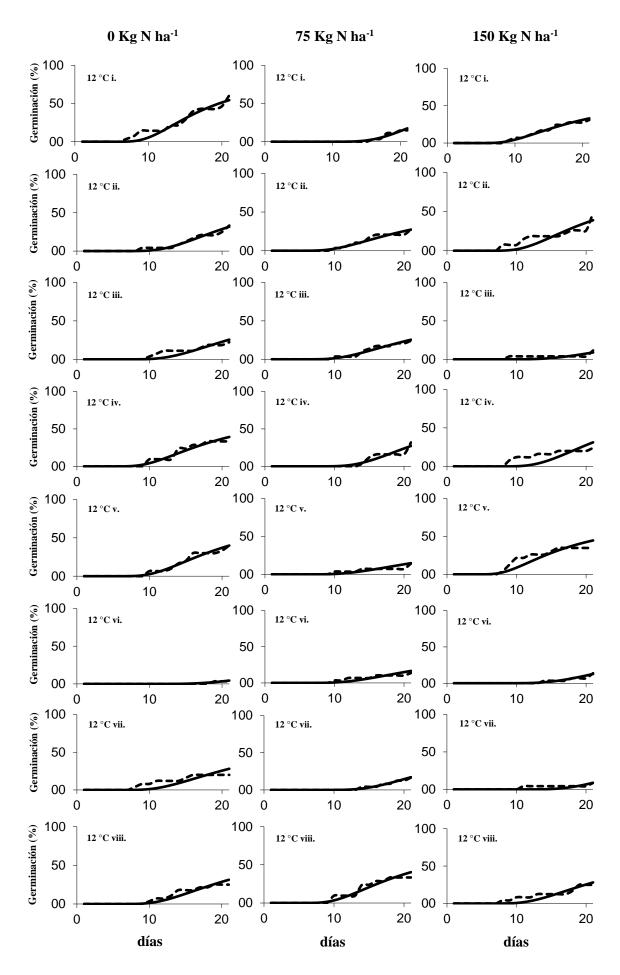


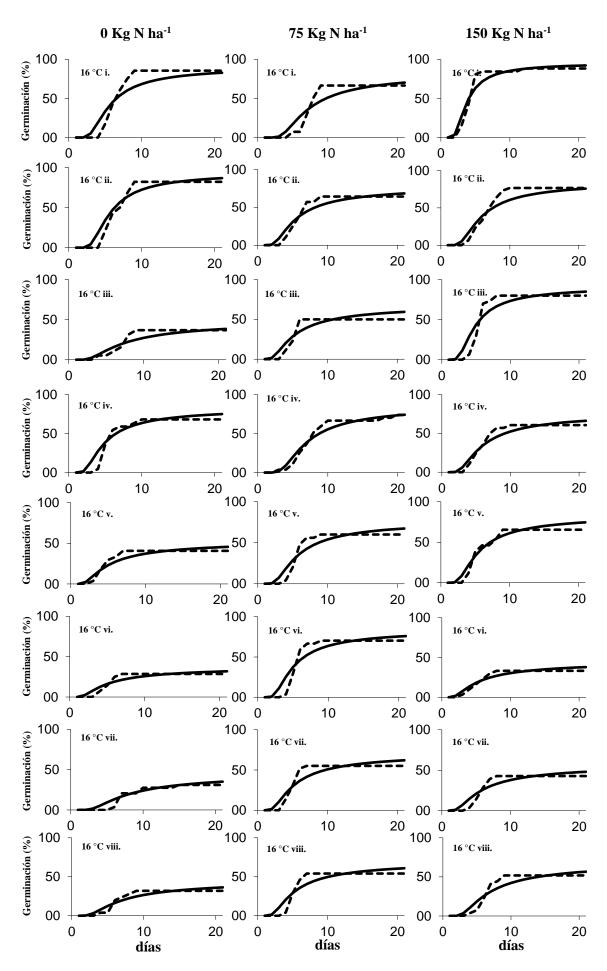


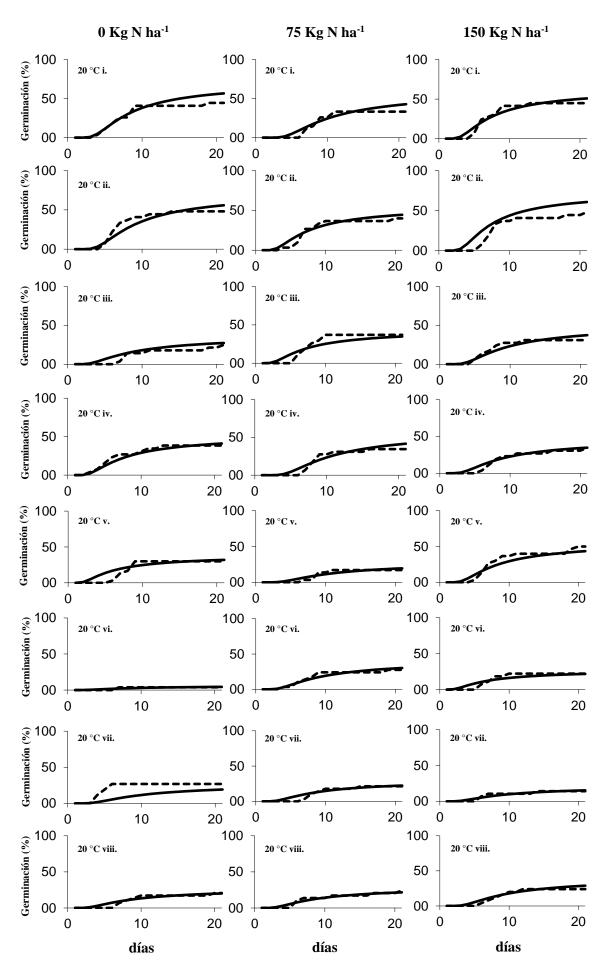


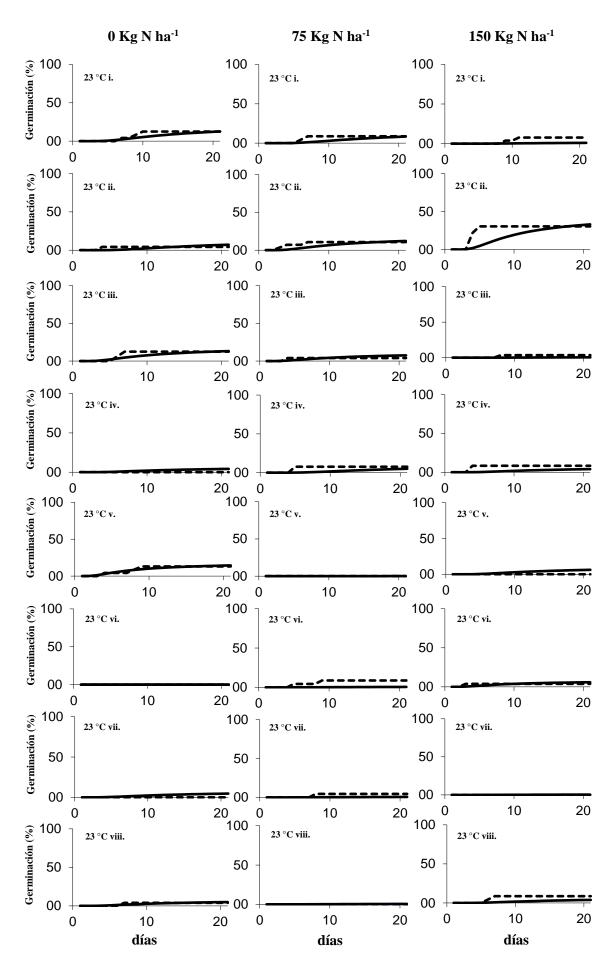


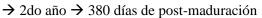


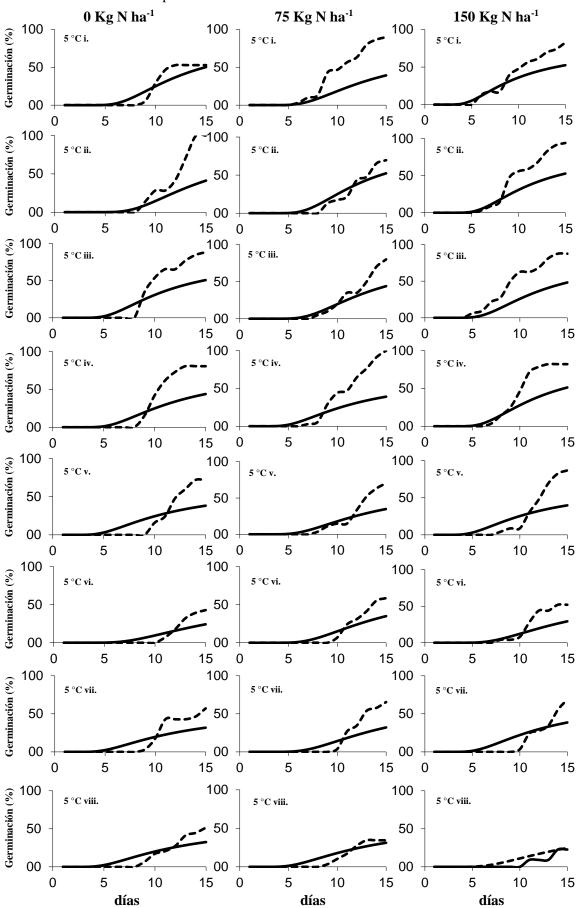


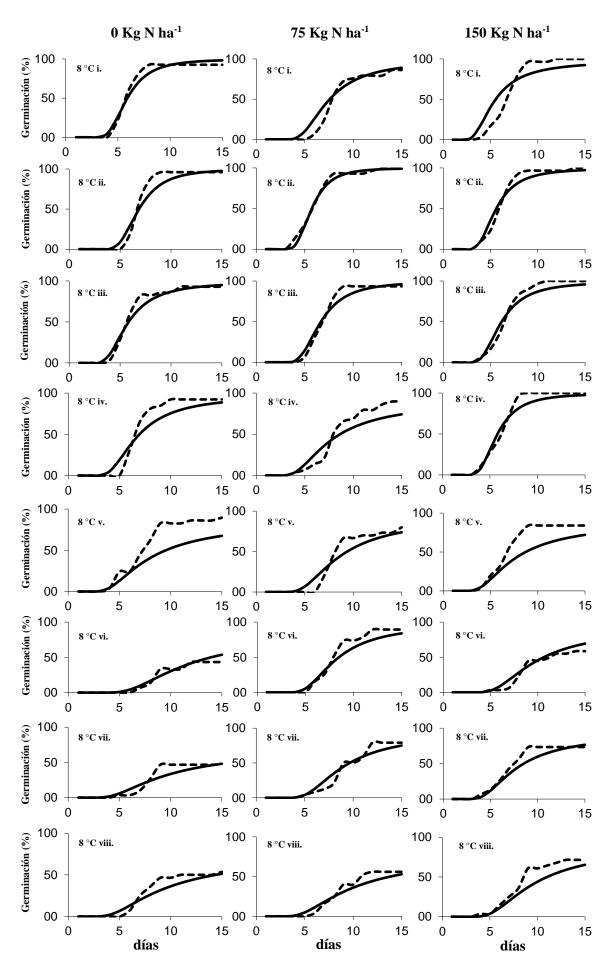


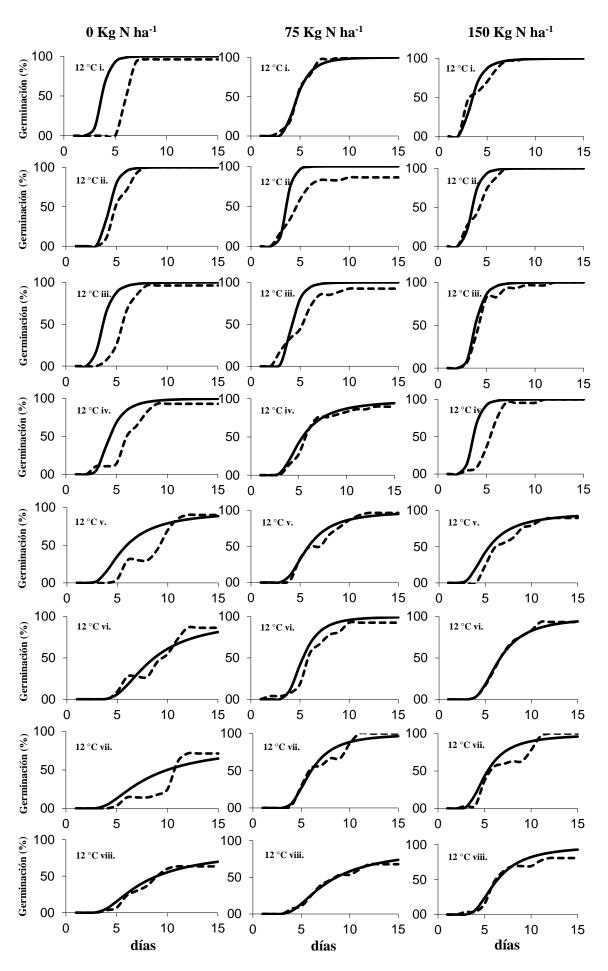


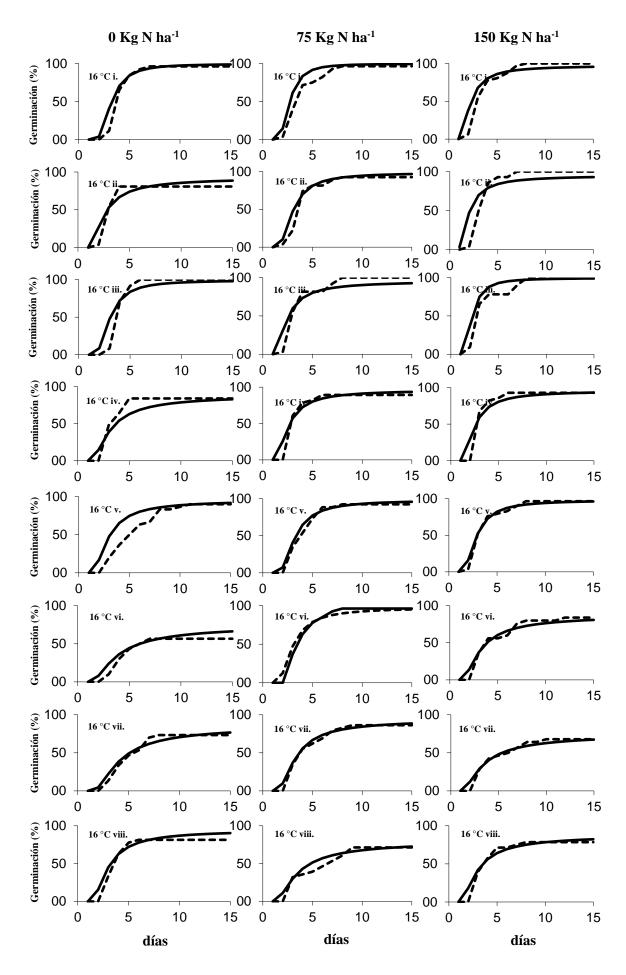


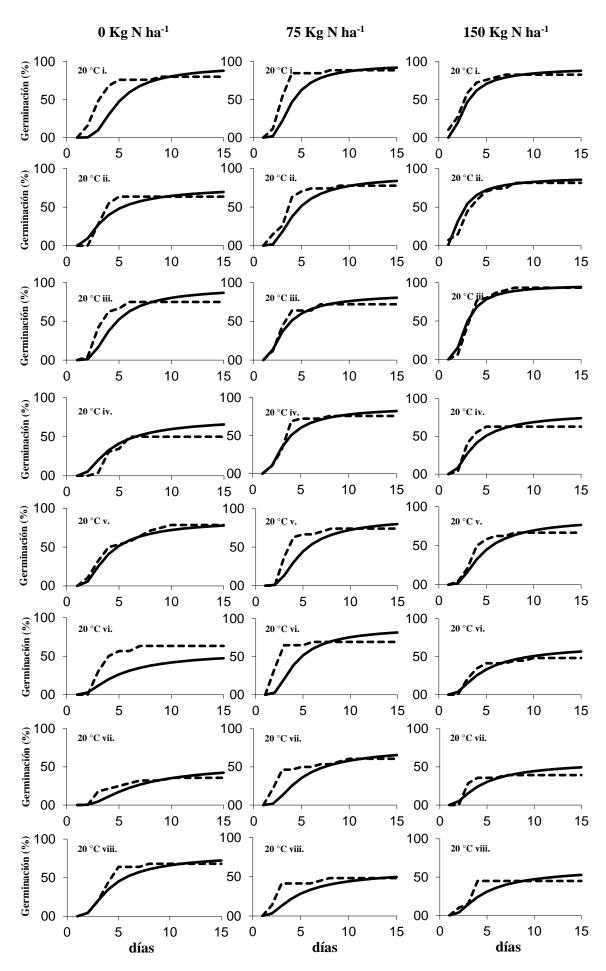












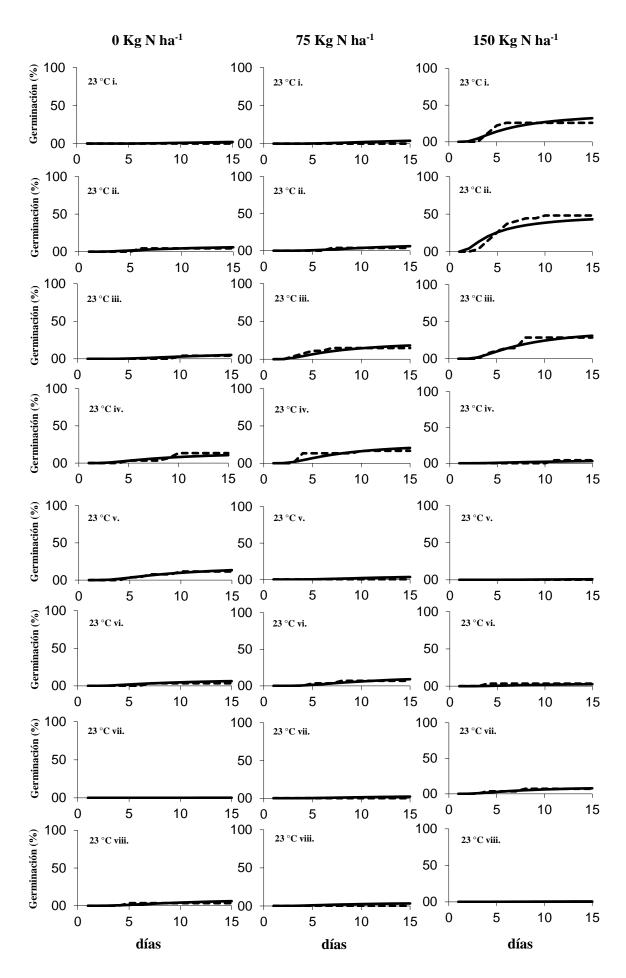
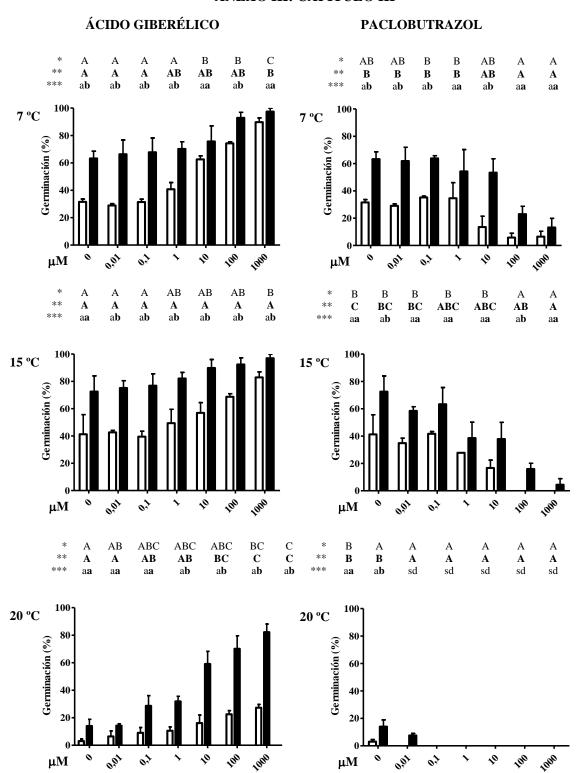
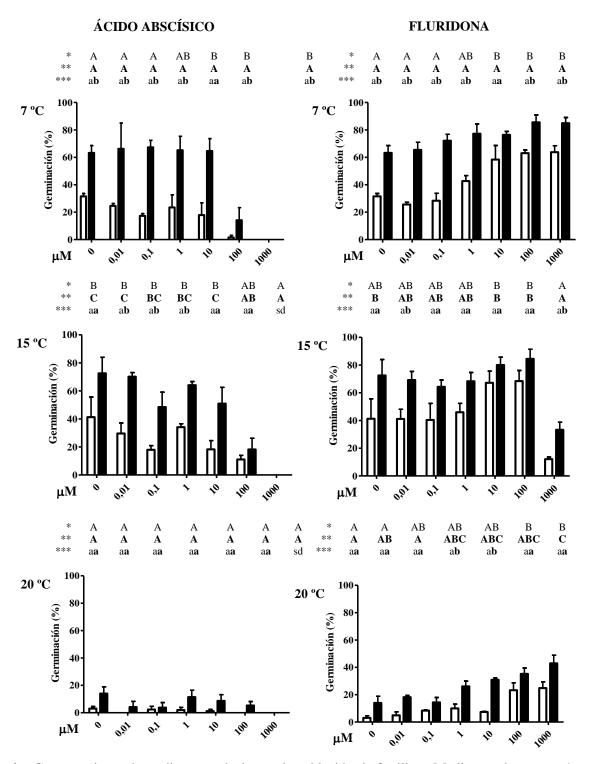


Figura II.V Curvas de germinación acumulada, para el primer y segundo año experimental a los 90 y 380 días de post-germinación, obtenidas experimentalmente (---) y simuladas (----) provenientes de semillas cuyas madres fueron sometidas a un gradiente de fertilización nitrogenada. Incubación por 21 días a 5, 8, 12, 16, 20 y 23 °C.

ANEXO III: CAPÍTULO III



- * Comparaciones de medias entre dosis para la población sin fertilizar. Medias con letras común no son significativamente diferentes según el test de Tukey (p>0.005).
- ** Comparaciones de medias entre dosis para la población fertilizada. Medias con letras común no son significativamente diferentes según el test de Tukey (p>0.005).
- *** Comparaciones de medias entre poblaciones para cada dosis. Medias con letras común no son significativamente diferentes según el test de Bonferroni (p>0,005).
- sd Sin Datos. Corresponde a la ausencia de germinación.



* Comparaciones de medias entre dosis para la población sin fertilizar. Medias con letras común no son significativamente diferentes según el test de Tukey (p>0.05).

Figura III.I Efectos del ABA, FLU, GA₃ y PAC sobre la germinación de semillas dormidas derivadas de plantas sin fertilizar (barras blancas) y fertilizadas con urea granulada (barras negras)

^{**} Comparaciones de medias entre dosis para la población fertilizada. Medias con letras común no son significativamente diferentes según el test de Tukey (p>0.05).

^{***} Comparaciones de medias entre poblaciones para cada dosis. Medias con letras común no son significativamente diferentes según el test de Bonferroni (p>0,05).

sd Sin Datos. Corresponde a la ausencia de germinación.

a 7, 15 y 20 °C. Los porcentajes de germinación fueron determinados luego de 32 días en función de las semillas viables. Se muestran los valores re-transformados de arc-coseno raíz, las barras de error manifiestan el error estándar de la media de tres réplicas.

Tabla III.I Efectos de las dosis de las hormonas testeadas (GA₃: ácido giberélico; PAC: paclobutrazol; ABA: ácido abscísico y FLU: fluridona) en semillas de madres sN (madres sin fertilizar) y cN (madres fertilizadas) en condiciones de temperatura sub-óptima (7 °C), óptima (15 °C) y supra-óptima (20 °C).

	TMA	7 °C	15 °C	20 °C
CA	sN	0,0002**	0,0084**	0,0024**
GA ₃	cN	0,0478*	0,0079**	0,0014**
PAC	sN	0,0041**	<0,0001**	0,0154*
PAC	cN	0,0059**	0,0008**	<0,0001**
A D A	sN	0,0002**	0,0007**	0,5195 ^{ns}
ABA	cN	0,0478*	<0,0001**	0,3414 ^{ns}
FLU	sN	0,0002**	0,0084**	0,0024**
FLU	cN	0,0478**	0,0079**	0,0014**

	7 °C	15 °C	20 °C		
G ₅₀ (µM)	10,73	6,304	3,976		
\mathbb{R}^2	0,6971	0,506	0,7845		
<i>p</i> -valor		0,4613 ^{ns}			
G ₅₀ (µM) _{global}	al 6,730				
\mathbf{R}^2 global	0,6396				

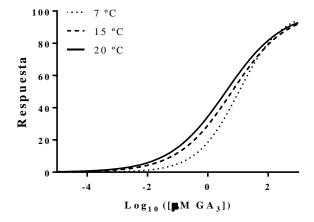


Figura III.II Curva de dosis-respuesta a dosis crecientes de ácido giberélico (GA₃) de los valores promedios de las dos accesiones para las tres temperaturas evaluadas.

ANEXO IV: CAPÍTULO IV

IV.I Influencia de la disponibilidad hídrica y nitrogenada sobre atributos de la biomasa aérea.

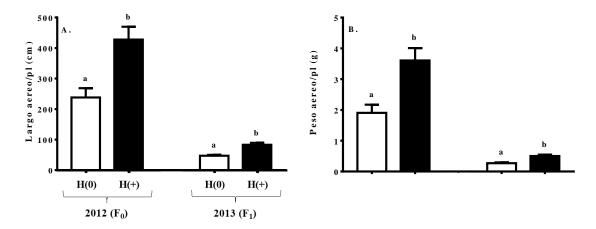


Figura IV.I Medias (\pm ES), por planta, re-transformadas del logaritmo de: **A.** Largo aéreo (tallos y ramas) y **B.** Peso aéreo según el tratamiento materno ambiental de disponibilidad hídrica (barras blancas: baja, barras negras: alta) para el 2012 (F_0) y la siguiente generación en el 2013 (F_1). Letras distintas indican diferencias estadísticamente significativas según el test de Tukey (α =5%).

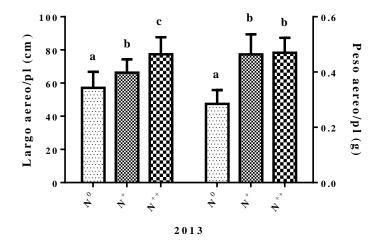
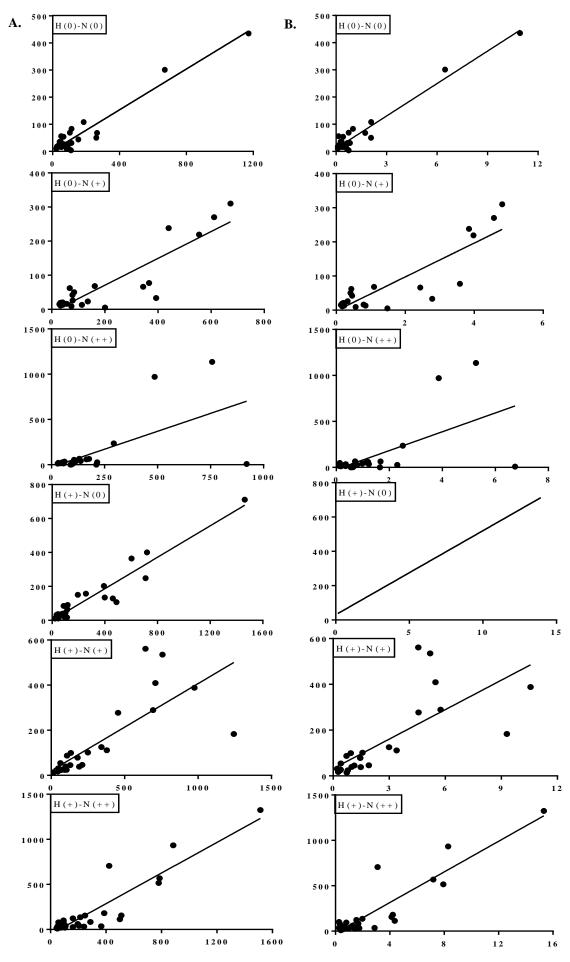


Figura IV.II Medias (\pm ES), por planta, re-transformadas del logaritmo del largo aéreo (tallos y ramas) y del peso aéreo según el tratamiento materno ambiental de fertilización nitrogenada (N(0): 0, N(+): 75 y N(++): 150 kg N ha⁻¹) para la F₁ (2013, plantas madres de la F₂). Letras distintas indican diferencias estadísticamente significativas según el test de Tukey (α = 5%).

Tabla IV.I Pantas logradas en cada UE en cada año. Los diferentes tratamientos a los que fueron sometidos las plantas no ejercieron influencia en el número total de plantas logradas (*p*>0,05).

ΑÑ	Ю		2	012			2	2013	
TMA	UE →	1	2	3	4	1	2	3	4
H(0) N(0)		130	23	81	14	240	144	124	175
H(0) N(+)		107	79	82	34	181	199	185	161
H(0) N(++)		35	61	54	106	182	189	167	149
$\mathbf{H}(+) \mathbf{N}(0)$		55	124	51	103	207	159	189	154
$\mathbf{H}(+) \mathbf{N}(+)$		77	76	87	143	309	176	194	218
H(+) N(++)		67	94	115	49	191	157	199	130



María de las Mercedes Longás

Figura IV.III Regresiones lineales de la producción seminal por planta en función de la biomasa aérea. **A.** Cantidad de semillas producidas en función del largo total de tallos y ramas. **B.** Cantidad de semillas producidas en función del peso de la biomasa aérea.

IV.II Perímetros y áreas de las semillas analizadas

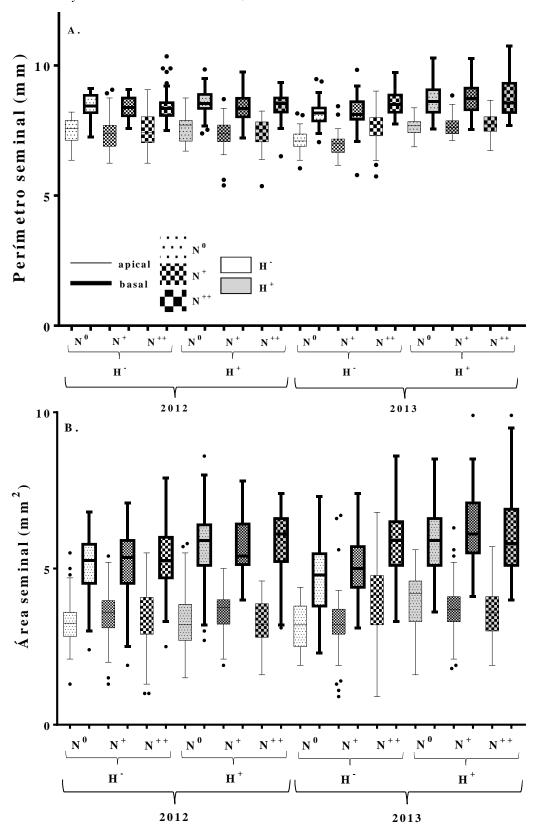


Figura IV.IV Gráficos de cajas y brazos donde se expone toda la información del tamaño seminal expresado como (**A**) perímetro y (**B**) área, de las semillas analizadas (n=1536) bajo las diferentes ubicaciónes en la planta madre (apical y basal) y tratamientos maternos ambientales (gradiente nitrogenado combinado con dos niveles hídricos) para los dos años de estudio.

IV.III Resultados del ANAVA para los atributos seminales analizados en función de los factores impuestos y sus interacciones.

Tabla III.II Tablas de ANAVA para los diferentes atributos seminales evaluados.

Variable	N	\mathbb{R}^2	R ² Ajustado	CV	
Perímetro	384	0,65	0,62	5,15	
Factor	SC	gl	CM	F	<i>p</i> -valor
AP	0,15	1	0,15	0,89	0,3469 ^{ns}
H_2O	3,79	1	3,79	22,47	<0,0001***
N	1,49	2	0,74	4,41	0,0129*
UPL	91,05	1	91,05	539,66	<0,0001***
$AP* H_2O$	3,27	1	3,27	19,37	<0,0001***
AP*N	1,61	2	0,81	4,77	0,0090**
AP*UPL	0,15	1	0,15	0,9	$0,3428^{ns}$
H_2O*N	1,10	2	0,5	3,26	0,0396*
H_2O*UPL	0,004	1	0,004	0,02	0.8776^{ns}
N*UPL	0,24	2	0,12	0,72	0,4893 ^{ns}
$AP* H_2O*N$	0,76	2	0,38	2,27	$0,1054^{\text{ns}}$
AP* H ₂ O*UPL	0,05	1	0,05	0,31	$0,5764^{\text{ns}}$
AP*N*UPL	0,11	2	0,06	0,33	$0,7185^{ns}$
H ₂ O*N*UPL	0,08	2	0,04	0,23	$0,7945^{\text{ns}}$
AP* H ₂ O*N*UPL	0,0013	2	0,00065	0,039	0,9961 ^{ns}

Variable	N	\mathbb{R}^2	R ² Ajustado	CV	
Peso	384	0,7	0,68	16,49	
Factor	SC	gl	CM	F	<i>p</i> -valor
AP	3,66	1	3,66	6,48	0,0114*
H_2O	18,39	1	18,39	32,58	<0,0001***
N	4,85	2	2,42	4,29	0,0,144*
UPL	381,2	1	381,2	675,18	<0,0001***
$AP* H_2O$	3,38	1	3,38	5,98	0,0150*
AP*N	3,39	2	1,69	3	0,0512*
AP*UPL	$4,4*10^{-3}$	1	$4,4*10^{-3}$	0,01	$0,9295^{\text{ns}}$
H_2O*N	4,87	2	2,43	4,31	0,0142*
H_2O*UPL	8,23	1	8,23	14,57	0,0002***
N*UPL	1,47	2	0,74	1,31	$0,2723^{\text{ns}}$
$AP* H_2O*N$	2,19	2	1,09	1,94	$0,1456^{\text{ns}}$
AP* H2O*UPL	$6,7*10^{-4}$	1	$6,7*10^{-4}$	$1,2*10^{-3}$	$0,9725^{\text{ns}}$
AP*N*UPL	1,39	2	0,7	1,24	0,2921 ^{ns}
$H_2O*N*UPL$	0,02	2	0,01	0,02	$0,9786^{ns}$
AP* H ₂ O*N*UPL	0,53	2	0,26	0,4	0,6260 ^{ns}

Variable	N	\mathbb{R}^2	R ² Ajustado	CV	
Peso pericarpio	96	0,78	0,69	17,25	
Factor	SC	gl	CM	F	<i>p</i> -valor
AP	2,17	1	2,17	10,33	0,0022**
H_2O	2,6	1	2,6	12,42	0,0009***
N	0,09	2	0,045	0,23	$0,7991^{\text{ns}}$
UPL	27,40	1	27,40	130,72	<0,0001***
AP* H ₂ O	0,96	1	0,96	4,57	0,0,369*
AP*N	1,97	2	0,98	4,7	0,0130*
AP*UPL	0,1	1	0,1	0,47	$0,4975^{\text{ns}}$
H_2O*N	0,13	2	0,06	0,3	$0,7397^{\text{ns}}$
H ₂ O*UPL	0,82	1	0,82	3,91	$0.053^{\text{ns/*}}$
N*UPL	1,17	2	0,59	2,79	$0.0699^{\text{ns/*}}$
AP* H ₂ O*N	1,0	2	0,5	2,38	$0,1022^{ns}$
AP* H ₂ O*UPL	0,01	1	0,01	0,07	$0,7920^{\text{ns}}$
AP*N*UPL	1,42	2	0,71	3,38	$0,0412^*$
H ₂ O*N*UPL	1,1	2	0,55	2,62	0,0814 ^{ns}
AP* H ₂ O*N*UPL	0,06	2	0,03	0,15	0.8584^{ns}

Variable	N	\mathbb{R}^2	R ² Ajustado	CV	
Log_{10} (IF)	96	0,37	0,15	6,89	

Factor	SC	gl	CM	F	<i>p</i> -valor
AP	0,0019	1	0,0019	12,93	0,0006***
H_2O	$3,1*10^{-6}$	1	$3,1*10^{-6}$	0,02	0,8833 ^{ns}
N	$5,7*10^{-4}$	2	$2,8*10^{-6}$	0,02	0,9806 ^{ns}
UPL	$2,7*10^{-4}$	1	$2,7*10^{-4}$	1,85	$0,1784^{\text{ns}}$
AP* H ₂ O	0,0012	1	0,0012	8,34	0,0052**
AP*N	$1,2*10^{-4}$	2	$6,2*10^{-5}$	0,43	$0,6532^{\text{ns}}$
AP*UPL	$6,1*10^{-4}$	1	$6,1*10^{-4}$	4,19	0,0446*
H_2O*N	$2,8*10^{-4}$	2	$1,4*10^{-4}$	0,98	$0,3807^{ns}$
H_2O*UPL	$3,3*10^{-6}$	1	$3,3*10^{-6}$	0,02	$0,8809^{ns}$
N*UPL	$2,5*10^{-4}$	2	$1,2*10^{-4}$	0,86	$0,4289^{\text{ns}}$
$AP* H_2O*N$	$1,1*10^{-5}$	2	$5,5*10^{-6}$	0,04	0.9627^{ns}
AP* H ₂ O*UPL	$3,8*10^{-5}$	1	$3,8*10^{-5}$	0,26	$0,6103^{ns}$
AP*N*UPL	$1,9*10^{-4}$	2	$9,7*10^{-5}$	0,67	$0,5142^{ns}$
H ₂ O*N*UPL	$5,1*10^{-4}$	2	$2,6*10^{-4}$	1,76	0,1791 ^{ns}
AP* H ₂ O*N*UPL	$3,1*10^4$	2	$1,6*10^{-4}$	1,08	0,3467 ^{ns}

Variable	N	\mathbb{R}^2	R ² Ajustado	CV	
Arc sen √(emergencia)	96	0,49	0,31	42,09	
Factor	SC	gl	CM	${f F}$	<i>p</i> -valor
AP	1,01	1	1,01	22,55	<0,0001***
H_2O	0,004	1	0,004	0,09	$0,7658^{\text{ns}}$
N	0,06	2	0,03	0,69	$0,5031^{\text{ns}}$
UPL	0,51	1	0,51	11,39	0,0012**
AP* H ₂ O	0,11	1	0,11	2,54	$0,116^{ns}$
AP*N	0,22	2	0,11	2,46	$0,0931^{\text{ns}}$
AP*UPL	0,22	1	0,22	4,83	0,0315*
H_2O*N	0,46	2	0,23	5,09	0,0088**
H_2O*UPL	0,03	1	0,03	0,64	0,4266 ^{ns}
N*UPL	0,01	2	0,01	0,16	0.8482^{ns}
$AP* H_2O*N$	0,03	2	0,015	0,36	$0,6972^{\text{ns}}$
AP* H ₂ O*UPL	0,02	1	0,02	0,46	$0,5009^{ns}$
AP*N*UPL	0,01	2	0,0031	0,07	0.9322^{ns}
$H_2O*N*UPL$	0,0041	2	0,002	0,05	0,9554 ^{ns}
AP* H ₂ O*N*UPL	0,07	2	0,0035	0,82	0,4444 ^{ns}