



**UNIVERSIDAD NACIONAL DEL SUR**

TESIS DE MAGISTER EN CIENCIAS AGRARIAS

MANEJO DE *Euphorbia davidii* Subils: DINAMICA POBLACIONAL,  
CONTROL QUIMICO Y EVALUACIÓN DE SENSIBILIDAD A GLIFOSATO.

FEDERICO ROBERTO NUÑEZ FRE

BAHIA BLANCA

ARGENTINA

2019

**PREFACIO**

Esta Tesis se presenta como parte de los requisitos para optar al grado Académico de Magíster en Ciencias Agrarias, 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 ámbito del Departamento de Agronomía durante el período comprendido entre el 1 de octubre de 2013 y el 18 de abril de 2018 bajo la dirección del Ing. Agr. MSc. Víctor Fabián Juan (Facultad de Agronomía, UNCPBA) y la codirección del Dr. Guillermo R. Chantre (Departamento de Agronomía, UNS).

.....



UNIVERSIDAD NACIONAL DEL SUR  
Secretaría General de Posgrado y Educación Continua

La presente tesis ha sido aprobada el ..../..../....., mereciendo la calificación de .... (.....).

## **RESUMEN**

*Euphorbia davidii*, es una maleza anual de ciclo primavero – estival presente en los cultivos de verano en el centro y sudeste de la provincia de Buenos Aires. Para su estudio se abordaron aspectos relativos a su dinámica poblacional y se analizaron factores que pueden afectar su control con glifosato. A partir de los resultados obtenidos se confirmó que *E. davidii* desarrolla bancos de semillas persistentes, con una abundancia de más de 11000 semillas m<sup>-2</sup> en lotes muestreados en la localidad de Olavarría y más de 20000 semillas m<sup>-2</sup> en los correspondientes a Azul. Con respecto a la distribución vertical de las mismas, se pudo apreciar que, bajo sistemas de siembra directa continua, cerca del 80% de las semillas se encontraban en el estrato superficial (0 a 5 cm), mientras que por efecto de labranza ese porcentaje se redujo hasta el 50% aproximadamente. La viabilidad de los propágulos en el estrato superficial fue superior al 70% y se redujo hasta un 50% en el estrato más profundo. La germinación mostró una marcada variabilidad y se manifestó claramente un efecto de dormición de las semillas. Refiriéndose a aspectos demográficos, se detectaron tres cohortes que en promedio totalizaron 1500 plantas m<sup>-2</sup>, la primera emergió a mediados de octubre, la segunda a principios de noviembre, y la última entre finales de noviembre y principios de enero. Más del 80% de las emergencias registradas pertenecieron a la primera y segunda cohorte. Los requerimientos de tiempo térmico calculados para alcanzar los estadios de 2-4 hojas, 6-8 hojas, ramificación y floración fueron 192, 370, 515 y 1155 °Cd, respectivamente. La producción promedio de semillas en la primera, segunda y tercera cohorte fue de 5700, 6400 y 1900 semillas m<sup>-2</sup>, determinando un número total de las tres cohortes de aproximadamente 14000 semillas m<sup>-2</sup>. Para comparar la sensibilidad a glifosato de diferentes poblaciones de *E. davidii*, se emplearon dos técnicas: bioensayo con semillas y determinación de shikimato sobre

plantas tratadas con glifosato. La población más sensible fue la de Espartillar, con una  $CE_{50}$  (concentración efectiva media) de 4 g e.a.  $l^{-1}$ . En base a este valor, se determinaron los índices de resistencia que fueron de 1,76; 2,39 y 2,48 para Azul, Olavarría y Barrow respectivamente. Mediante la determinación de shikimato, sólo se manifestó un incremento significativo de la concentración de este metabolito en la población de Espartillar. En las otras poblaciones no se detectó acumulación de shikimato lo que evidencia una sensibilidad diferencial a glifosato de las poblaciones estudiadas. En evaluaciones de control químico con glifosato bajo diferente contenido de nutrientes en el suelo (fósforo y azufre) se observaron diferencias significativas en el peso seco entre las dosis aplicadas solamente en niveles bajos de fósforo. Con respecto a la fitotoxicidad final, solo se manifestaron diferencias significativas entre dosis aplicadas en niveles bajos y altos de azufre. Además, se observaron diferencias en la velocidad de manifestación de síntomas en varios niveles de ambos nutrientes.

Los conocimientos ecofisiológicos sobre *E. davidii* aportados en este trabajo de tesis contribuirán a la implementación de planes de manejo integrados de malezas más eficientes.

## **ABSTRACT**

*Euphorbia davidii*, is a summer annual weed present in the center and southeast of the Buenos Aires province crops. Aspects related to its population dynamics and factors that can affect the control obtained with glyphosate were analyzed. From these studies, it was confirmed that *E. davidii* develops persistent seed banks, with an abundance of more than 11,000 seeds  $m^{-2}$  in lots sampled at Olavarría district and more than 20,000 seeds  $m^{-2}$  in those corresponding to Azul district. In regard to the vertical distribution of seeds, it was possible to appreciate that under continuous no-till seeding systems, about 80% of the

seeds were found in the superficial layer (0 to 5 cm), while by tillage effect that percentage was reduced up to 50% approximately. The viability of the propagules in the superficial layer was greater than 70% and was reduced to 50% in the deepest layer. The germination showed a significant variance and a noticeable effect of dormancy was manifested. Concerning demographic aspects, three cohorts were detected that averaged 1,500 plants  $m^{-2}$ , the first emerged in mid-October, the second in the beginning of November, and the last between the end of November and the beginning of January. More than 80% of registered seedlings belonged to the first and second cohorts. Thermal time requirements calculated to reach 2-4 leaves, 6-8 leaves, branching and flowering stages were 192, 370, 515 and 1155  $^{\circ}Cd$ , respectively. Average seed production in the first, second and third cohorts was 5,700, 6,400 and 1,900 seeds  $m^{-2}$ , determining an overall from the three cohorts of about 14,000 seeds  $m^{-2}$ . Glyphosate sensitivity comparison of different populations of *E. davidii* was made by two techniques: seeds bioassay and shikimate determination from whole plants treated with glyphosate. The most sensitive population was Espartillar, with an  $EC_{50}$  (mean effective concentration) of 4 g a.e.  $l^{-1}$ . Based on this value, resistance indexes of 1,76; 2,39 and 2,48 for Azul, Olavarría and Barrow were established respectively. Shikimate determinations, only registered a significant increase in this metabolite concentration in the Espartillar population. In the other populations no shikimate accumulation was detected, showing differential glyphosate sensitivity between the studied populations. Chemical control with glyphosate under different nutrient content in soil (phosphorus and sulfur), only evidenced significant differences in dry weight between the diverse doses applied under low phosphorus levels. Phytotoxicity at the ends of trials, only manifested significant differences between applied doses in both low and high sulfur levels. In addition, symptoms manifestation had different speeds in various levels of both nutrients evaluated.

The ecophysiological knowledge of *E. davidii* provided by the present thesis work, will contribute to the implementation of more efficient integrated weed management plans.

**Certifico que fueron incluidos los cambios y correcciones sugeridas por los jurados.**

.....  
**Firma del Director**

## **Índice general**

- **CAPITULO I:** Introducción general, marco teórico y descripción de la problemática ..... pág. 13
  
- **CAPITULO II:** Evaluación del banco de semillas de *Euphorbia davidii* en lotes agrícolas de la provincia de Buenos Aires ..... pág. 32
  
- **CAPITULO III:** Estudios demográficos de *Euphorbia davidii* ..... pág. 56
  
- **CAPITULO IV:** Control químico: comparación de la sensibilidad de poblaciones de *Euphorbia davidii* a glifosato e influencia del estado nutricional sobre la eficacia de control ..... pág. 81
  
- **CAPITULO V:** Consideraciones finales..... pág. 120

## **Índice de tablas**

Tabla 1. Diferencias morfológicas entre *E. davidii* y *E. dentata*.

Tabla 2. Cantidad total de semillas de *E. davidii* recolectadas sobre muestras de suelo de 0 a 20 cm de profundidad en lotes agrícolas de Olavarría y Azul, provincia de Buenos Aires (2012 y 2014).

Tabla 3. Cantidad total de semillas de *E. davidii* m<sup>-2</sup> recolectadas sobre muestras de suelo de 0 a 5, 5 a 10, 10 a 15 y 15 a 20 cm de profundidad en lotes agrícolas de Olavarría y Azul, provincia de Buenos Aires.

Tabla 4. Distribución vertical de las semillas de *E. davidii* encontradas hasta los 20 cm de profundidad, en porcentaje respecto del total cuantificado, para los dos sitios muestreados en mayo y septiembre (2012 y 2014).

Tabla 5. Información climática obtenida en la Estación Meteorológica Olavarría (2011/12 y 2013/14).

Tabla 6. Tiempo térmico (°Cd) calculado para cada estado fenológico, y cada cohorte, agrupando ambos años (2011/12 y 2013/14).

Tabla 7. Mortalidad de *E. davidii*, expresada semanalmente para cada cohorte en 2011/2012.

Tabla 8. Mortalidad de *E. davidii*, expresada semanalmente para cada cohorte en 2013/2014.

Tabla 9. Producción de semillas individual y poblacional, y densidad de población por cohorte (2011/12 y 2013/14).

Tabla 10. Resultados de los análisis de las muestras extraídas de suelo previo a su utilización para los ensayos correspondientes de fósforo y azufre.



Tabla 11. Porcentaje de germinación promedio de semillas de *E. davidii* obtenido a los 21 días, en las diferentes concentraciones de glifosato evaluadas, para cada población procedente de las localidades de Espartillar, Azul, Olavarría y Barrow.

Tabla 12. Concentración efectiva media ( $CE_{50}$ ) obtenidas de las ecuaciones de ajuste del modelo log-logístico, para el parámetro porcentaje de germinación de semillas de *E. davidii*, procedente de las localidades de Espartillar, Azul, Olavarría y Barrow.

Tabla 13. Pendientes (b) obtenidas de las ecuaciones de ajuste del modelo log-logístico, para el parámetro porcentaje de germinación de semillas de *E. davidii*, procedente de las localidades de Espartillar, Azul, Olavarría y Barrow.

Tabla 14. Concentración de shikimato en hojas de *E. davidii* ( $\mu\text{g}$  de shikimato  $\text{g}^{-1}$  de peso fresco) determinado 72 horas luego de la aplicación de las diferentes dosis de glifosato (0, 540 y 1080 g e.a.  $\text{ha}^{-1}$ ).

## **Índice de figuras**

Figura 1. Diferentes estados fenológicos de *E. davidii*.

Figura 2. Características morfológicas de la especie: ciatio.

Figura 3. Frutos (cápsulas) y semillas de *E. davidii*.

Figura 4. Distribución de *E. davidii* en Europa.

Figura 5. Distribución geográfica de *E. davidii* en el continente americano, y en mayor detalle en el área de estudio, zona centro de la provincia de Buenos Aires.

Figura 6. Porcentaje de germinación, en laboratorio, de semillas de *E. davidii*, extraídas de 4 estratos de profundidad en un lote agrícola de Olavarría, en mayo y septiembre (2012 y 2014).

Figura 7. Porcentaje de germinación, en laboratorio, de semillas de *E. davidii*, extraídas de 4 estratos de profundidad en un lote agrícola de Azul, en mayo y septiembre (2012 y 2014).

Figura 8. Porcentaje de viabilidad, en laboratorio, de semillas de *E. davidii*, extraídas de 4 estratos de profundidad en lotes agrícolas de Olavarría y Azul (2012 y 2014).

Figura 9. Dinámica poblacional de *E. davidii*, durante 2011/12.

Figura 10. Dinámica poblacional de *E. davidii*, durante 2013/14.

Figura 11. Dinámica poblacional promedio para los años 2011/12 y 2013/14. Los números indican el número de individuos  $m^{-2}$  y las flechas indican la probabilidad de transición entre diferentes estados fenológicos.

Figura 12. Producción de semillas de la población (2011/12 y 2013/14) en función de la densidad de *E. davidii*; y fecundidad (2011/12 y 2013/14) en función de la densidad de *E. davidii*.

Figura 13. Relación log-logística entre la germinación (%) y las concentraciones de glifosato evaluadas, de semillas de *Euphorbia davidii* procedentes de las localidades de Espartillar (E), Azul (A), Olavarría (O) y Barrow (B). Los valores de  $r^2$  obtenidos fueron de 0,912; 0,940; 0,966 y 0,995 respectivamente.

Figura 14. Evolución de la fitotoxicidad para los diferentes momentos de evaluación, en las dosis de 2, 3 y 4 l ha<sup>-1</sup> de glifosato, para el nivel bajo de fósforo.

Figura 15. Evolución de la fitotoxicidad para los diferentes momentos de evaluación, en las dosis de 2, 3 y 4 l ha<sup>-1</sup> de glifosato, para el nivel medio de fósforo.

Figura 16. Evolución de la fitotoxicidad para los diferentes momentos de evaluación, en las dosis de 2, 3 y 4 l ha<sup>-1</sup> de glifosato, para el nivel alto de fósforo.

Figura 17. Peso seco registrado a los 28 DDA para los diferentes niveles de fósforo, en las dosis de 2, 3 y 4 l ha<sup>-1</sup> de glifosato.

Figura 18. Evolución de la fitotoxicidad para los diferentes momentos de evaluación, en las dosis de 2, 3 y 4 l ha<sup>-1</sup> de glifosato, para el nivel bajo de azufre.

Figura 19. Evolución de la fitotoxicidad para los diferentes momentos de evaluación, en las dosis de 2, 3 y 4 l ha<sup>-1</sup> de glifosato, para el nivel medio de azufre.

Figura 20. Evolución de la fitotoxicidad para los diferentes momentos de evaluación, en las dosis de 2, 3 y 4 l ha<sup>-1</sup> de glifosato, para el nivel alto de azufre.

Figura 21. Peso seco registrado a los 28 DDA para los diferentes niveles de azufre, en las dosis de 2, 3 y 4 l ha<sup>-1</sup> de glifosato.

## **Agradecimientos**

A todos aquellos que me acompañaron y apoyaron durante el desarrollo de mis estudios de posgrado:

- A toda mi familia, mis padres, mis abuelos, mis sobrinos, mi hermana.
- A toda la Facultad de Agronomía de Azul, Universidad Nacional del Centro de la Provincia de Buenos Aires.
- A toda la cátedra de Terapéutica Vegetal (UNCPBA): Ing. Agr. Horacio Saint-André, Ing. Agr. Ricardo Fernández, y en especial a mi director de tesis Ing. Agr. MSc. Víctor Juan.
- Al Dr. Marcos Yannicari.
- A todo el Departamento de Agronomía de la Universidad Nacional del Sur, en particular a mi co-director de tesis, Dr. Guillermo Chantre.

# **CAPITULO I**

## **INTRODUCCIÓN GENERAL, MARCO TEÓRICO Y DESCRIPCIÓN DE LA PROBLEMÁTICA**

## **1. Introducción**

La familia *Euphorbiaceae* Juss. está representada en el mundo por aproximadamente 8900 especies (Govaerts et al., 2000). Si bien las mismas son cosmopolitas, en su mayoría habitan áreas tropicales y subtropicales (Bacigalupo, 2005). Entre ellas se encuentran especies de importante valor económico y otras que afectan a los cultivos comportándose como malezas.

En Argentina se han citado alrededor de 70 especies del género *Euphorbia* L., de las cuales cuatro de ellas se destacan como malezas importantes en cultivos: *Euphorbia serpens* Kunth, *Euphorbia heterophylla* L., *Euphorbia dentata* Michaux y *Euphorbia davidii* Subils.

El género *Euphorbia* es un taxón estructural y fisiológicamente diverso. Comprende individuos que van desde especies anuales hasta árboles (Shi y Jia, 1997) y en cuanto a su metabolismo es posible encontrar especies C3, C4 y CAM (Downtown, 1971). En la actualidad se conocen más de 60 especies C4 de este género (Downtown, 1975; Raghavendra y Das, 1978), y se han reportado 18 especies con metabolismo CAM (Szarek, 1979). En la revisión bibliográfica realizada, no se encontraron referencias específicas acerca del metabolismo de *Euphorbia davidii*, aunque es posible que sea C3, al igual que otras especies del género *Euphorbia* pertenecientes a la misma sección *Poinsettia* como *E. dentata* y *E. heteropylla* (Webster et al., 1975).

## **2. Descripción de la especie**

*Euphorbia davidii*, es una planta anual de porte erguido, de hasta 65 cm de altura con un tallo principal con entrenudos y ramificaciones (Figura 1). El mismo es más o menos largo, con varios entrenudos largos, de 2-9 cm que se acortan notablemente a partir de las ramificaciones de segundo orden.

La parte aérea de la misma es pubescente, presentando tricomas largos y cortos tanto en el tallo como en las hojas, principalmente del lado abaxial. En los tricomas cortos el número de células varía de 2 a 3 y en los largos de 5 a 6; la longitud total de los mismos (tricomas foliares o caulinares) varía entre 0,1 y 0,5 mm (Subils, 1984).

Los individuos presentan látex el cual puede ser apreciado desde el estado de plántula. Los tubos laticíferos de *Euphorbia* son de tipo no articulado ramificado (Fahn, 1985). La raíz principal es delgada con ramificaciones laterales, siendo más engrosada en la parte del cuello, de 0,5 a 1,5 cm, y no cuenta con raíces adventicias.

Las hojas son simples, pecioladas, alternas u opuestas según sean caulinares o florales, respectivamente. La forma de la lámina puede ser variada aún en un mismo ejemplar: ovada, elíptica, rómbica o subrómbica, de hasta 7 cm de largo por 3,5 cm de ancho. El borde es aserrado o dentado, con glándulas en los extremos de los dientes (Figura 1 D).

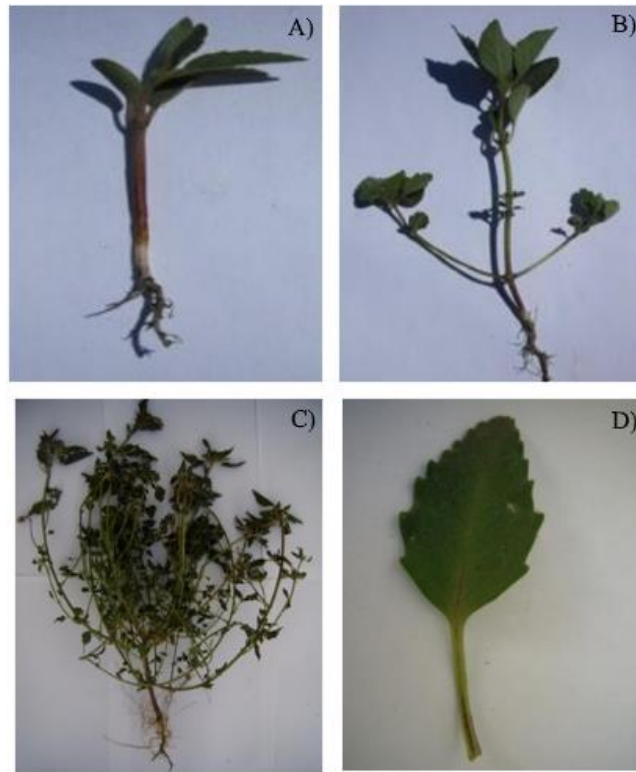


Figura 1. Diferentes estados fenológicos de *Euphorbia davidii*: plántula (A), ramificación (B), reproductivo (C). Características morfológicas de la especie: Hoja completamente expandida (D).

En el género *Euphorbia*, las flores son reducidas y están agregadas en una inflorescencia o agrupación de flores conocido como “ciatio”. Esta es una característica exclusiva que está presente solo en las especies de dicho género, no registrándose en ningún otro taxón del reino vegetal. Mientras que la mayoría de los grandes géneros de plantas difieren en características de las propias flores, en *Euphorbia* las variaciones se dan en las características del ciatio (Figura 2), que puede mostrar notables cambios en los diferentes grupos dentro del género. En las Euphorbiaceas todas las flores son unisexuales (solo masculinas o femeninas) y su tamaño es pequeño. Las flores masculinas están reunidas en grupos de 15 a 20 flores, desnudas, reducidas a un simple estambre pedicelado, dispuestas en 5 cimbras (Subils, 1984). Por su parte, las flores femeninas son pediceladas, presentan un breve rodete periántico (Subils, 1984), y pelos en la superficie del ovario.



Los estilos son bífidos y están soldados en la base. El ovario es sésil, tricarpelar, trilobular con un solo óvulo por lóculo.

El fruto es una cápsula globosa, tricoca, pubescente, a la madurez glabro (Figura 3A). En plantas creciendo en condiciones naturales se han registrado hasta 100 frutos/planta y cada uno de estos contiene tres semillas (Juan y Saint André, 1995). Las semillas son de color castaño o grisáceo, de forma más o menos redonda y de superficie rugosa, de 2 a 3 mm de diámetro y en la parte donde han estado adheridas al fruto poseen una cicatriz denominada carúncula de forma reniforme, que es una de las características utilizadas desde el punto de vista taxonómico (Figura 3B).

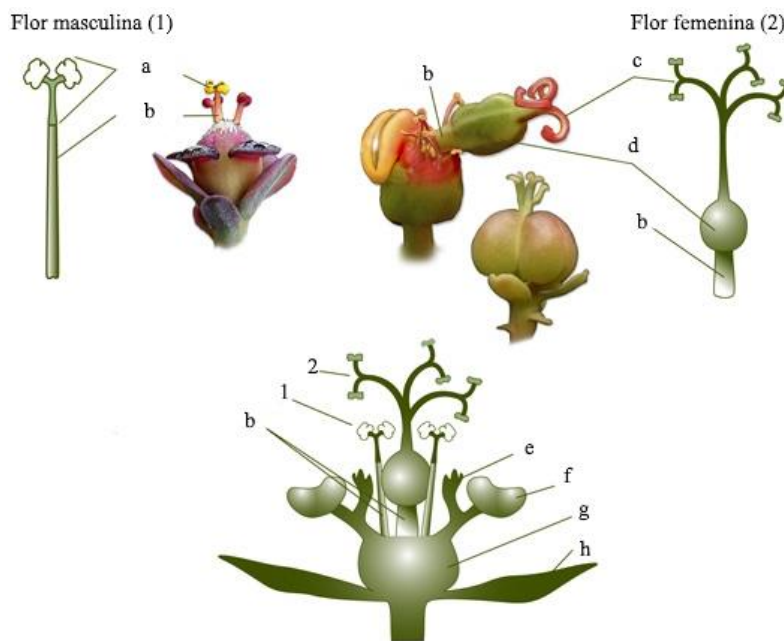


Figura 2. Características morfológicas de la especie: *ciatio*. Se pueden observar las flores masculinas (1) y femeninas (2) con sus respectivos estambres (a), pedicelos (b), estigmas (c) y ovario (d); y demás componentes del *ciatio*: bractéolas (e), glándulas (f), involucro (g) y ciatofilas (h). Adaptado de © PBI Euphorbia Project (disponible en <http://www.euphorbiaceae.org>)

Los frutos son cápsulas de dehiscencia elástica, que a la madurez se abren de forma explosiva dispersando las semillas alrededor de la planta madre en un radio de 360° favoreciendo la colonización de áreas circundantes. Si bien el rango de acción de este modo de dispersión es limitado, alcanzando sólo algunos metros, presenta la ventaja ecológica que no depende de vectores bióticos (insectos, aves, mamíferos, etc.) o factores abióticos (viento, agua, etc.) para la dispersión primaria. Este mecanismo de dispersión es el principal responsable de la distribución de las poblaciones en manchones, que se observa a nivel de lote. El otro mecanismo importante a esta escala, que es característico de las Euphorbiaceas y que ha sido observado particularmente en *E. davidii*, es la mirmecocoria, que implica el transporte de semillas por hormigas. Las semillas que cuentan con este mecanismo de dispersión secundaria normalmente poseen estructuras denominadas elaiosomas, ricas en lípidos, que estimulan el hábito de transporte (Brew et al., 1989). En el caso de esta especie, la carúncula carnosa de las semillas recién separadas del fruto presenta un atractivo particular para las hormigas. Se ha observado que las mismas recogen y trasladan propágulos que recientemente han caído al suelo por la dehiscencia de las cápsulas, e incluso cosechan los frutos de las plantas cercanas a los hormigueros a principio de otoño. Aunque la dispersión por mirmecocoria alcanza distancias limitadas, se reconoce la importancia de dicho mecanismo en la distribución espacial de ésta y otras especies de malezas (Beattie y Lyons, 1975; Pemberton e Irving, 1990; Gómez y Espadaler, 1994).

A una escala espacial más amplia, (regiones, distritos y países) los mecanismos principales de dispersión son otros. En el continente europeo se ha estudiado la distribución siguiendo los recorridos de las principales vías férreas y se revela que las menciones originales de la especie corresponden a hábitats cercanos a las estaciones de ferrocarril. También se destaca la distribución a través de las carreteras, el transporte por

agua en campos que sufren anegamiento o con escurrimiento superficial, entre otras (Oprea et al., 2012; Barina et al., 2013).

La viabilidad de semillas recientemente cosechadas, en general supera el 90 % y frecuentemente presentan dormición aparentemente asociada al efecto materno y la interacción genotipo ambiente.

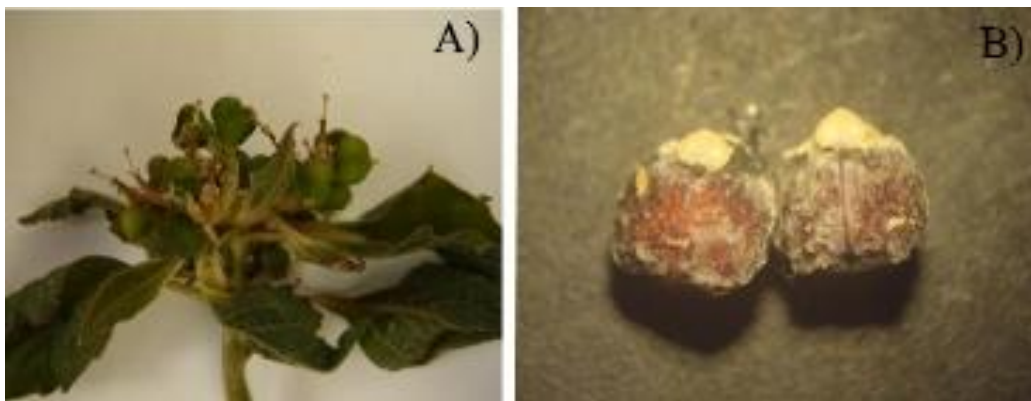


Figura 3. Frutos (cápsulas) (A) y semillas (B) de *Euphorbia davidii*.

### **3. Diferenciación morfológica de la especie**

Aunque en varios relevamientos de flora arvense ha sido clasificada erróneamente, *Euphorbia davidii* difiere de otra especie del mismo género con la cual ha sido confundida a nivel mundial, que es *E. dentata*. No obstante esto, aún hoy continua la controversia acerca de si son dos especies, o si *E. davidii* es una variedad dentro de *E. dentata* (Mayfield, 1997).

En estado de cotiledón y hasta las primeras hojas no se observan diferencias notables entre ambas malezas. Sin embargo, una particularidad sugerida para el reconocimiento de las plántulas, es la diferencia de longitud y predominancia de pelos largos y cortos entre ambas especies. *Euphorbia davidii* se caracteriza por la presencia de pelos muy cortos con algunos de mayor longitud en todos los órganos vegetativos mientras que en *E.*

*dentata* predominan los pelos largos que enmascaran a los pelos cortos (Marchessi et al., 2011a).

En cuanto al número cromosómico se destaca *E. davidii* es una especie tetraploide ( $2n=56$ ), mientras que *E. dentata* es diploide ( $2n=28$ ) (Barina et al., 2013).

Oprea et al. (2012) resumen las principales características morfológicas entre *E. dentata* y *E. davidii*, que pueden contribuir a la determinación fehaciente de las especies involucradas (Tabla 1).

Tabla 1. Diferencias morfológicas entre *Euphorbia davidii* y *Euphorbia dentata*.

	<i>Euphorbia davidii</i>	<i>Euphorbia dentata</i>
Tricomas en el lado abaxial de las hojas	Fuertemente cónicos, en una célula basal grande, con paredes verrugosas.	Cilíndricos, débiles en la base, sin células basales grandes, con paredes lisas.
Lacinia del ciatio	Glandular.	No glandular.
Ploidía	Tetraploide. $2n = 56$	Diploide. $2n = 28$
Semillas	Angulares en sección transversal, solamente un poco más larga que ancha, con una gran carúncula reniforme amarilla.	Redondeadas en sección transversal, claramente más larga que ancha, con una pequeña carúncula.

#### **4. Origen, historia y distribución geográfica**

*Euphorbia davidii* es originaria de Norteamérica, centro de EE.UU. y noroeste de México, habiéndose dispersado a través de las rutas al resto del continente.

Con respecto a la distribución mundial, además de las localizaciones antes mencionadas, se la reconoce como especie introducida e invasiva en Canadá (Figura 5a) (Missouri Botanical Garden, 2016) y Australia (Vladimirov y Petrova, 2009). También es posible que plantas reportadas en China (Ma y Liu, 2003) y Corea (Lee et al., 2009) puedan pertenecer también a *E. davidii*.

En Europa, *E. davidii* fue detectada por primera vez en Italia en 1995, siendo colectada y nombrada como *E. dentata* por Poldini et al. (1996), y luego reconsideradas como *E. davidii* por Galasso et al. (2011).

Más tarde, fue detectada en Bulgaria (Vladimirov y Petrova, 2009), en Francia en 2010 (Girod y Fried, 2011 y Hoffer-Massard, 2011), en Crimea en 2010 (Yena, 2011), en Suiza en 2011 (Hoffer-Massard, 2011), en Hungría en 2012 (Barina et al., 2013), y más recientemente en Serbia (Purger et al., 2015).

Además, según Barina et al. (2013), cuyo trabajo consistió en una revisión de ejemplares de *E. dentata* de varias procedencias citados en reportes realizados hasta 2011 como: Rusia (Mikheev, 1971), República de Moldavia (Myrza y Şabanova, 1992), Bélgica (Verloove, 2006), Ucrania (Kovalenko et al., 1993; Mosyakin y Yavorska, 2002), y Rumania (Oprea, 1997); se concluyó que sólo *E. davidii* se encuentra en todos estos países, y *E. dentata* se ha informado erróneamente (Figura 4).

Esta analogía entre *E. dentata* y *E. davidii*, difundida a nivel mundial, ha complicado el estudio de ambas especies, porque todos los reportes provenientes Europa y América publicados hasta 2011, mencionan exclusivamente a *E. dentata* sin considerar la

existencia *E. davidii* y actualmente, tanto la flora de estos sitios, como antiguos ejemplares depositados en herbarios de referencia, han tenido que ser reclasificados a esta última, indicándose en algunos casos la ausencia total de *E. dentata* en sitios donde se había reportado su presencia como maleza (Marchessi et al., 2011a; Oprea et al., 2012; Barina et al., 2013).

Particularmente en nuestro país, toda la bibliografía menciona a *E. davidii* como endemismo de las provincias de Córdoba y San Luis (Subils, 1984; Instituto de Botánica Darwinion, 2014; PlanEAR, 2014). La descripción original de la especie fue realizada por Subils (1984), quien menciona por primera vez a *Euphorbia davidii* Sect. *Poinsettia*, en base a ejemplares coleccionados en el Departamento de Río Cuarto, Córdoba y en el Departamento de Pringles, San Luis. Sin embargo, en estudios posteriores realizados por Mayfield (1997) se indicó que esta especie era sinónimo de dos variedades de *Euphorbia dentata* previamente identificadas en Estados Unidos, una de ellas identificada en Arizona en 1890 (*E. dentata* var. *gracillima* Millsp.) y la otra en Wisconsin en 1923 (*E. dentata* var. *lancifolia* Farwell).

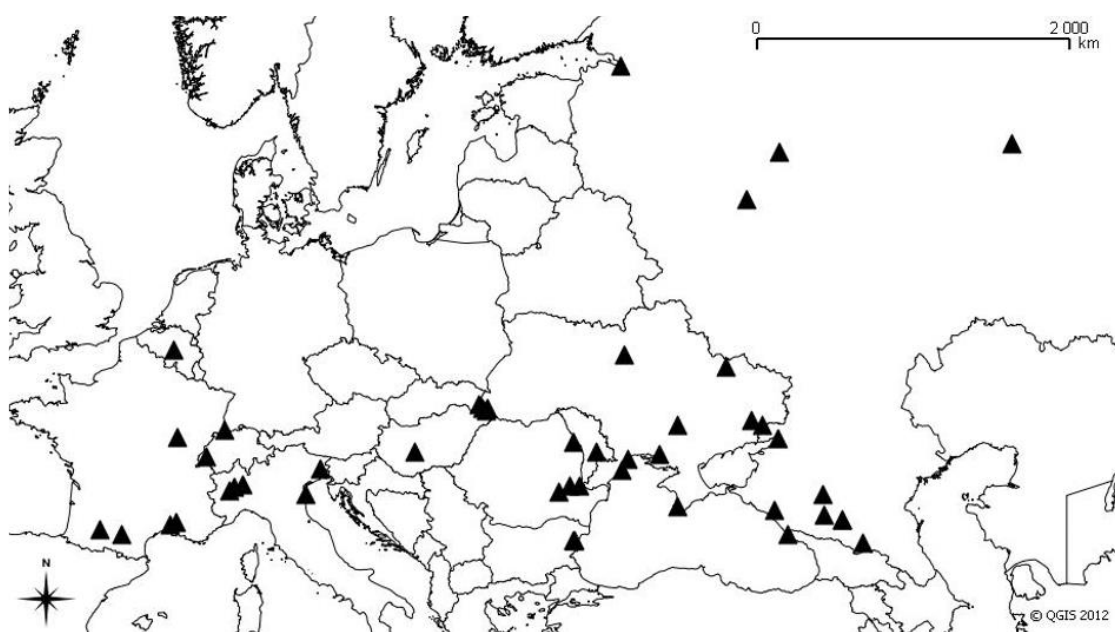


Figura 4. Distribución de *Euphorbia davidii* en Europa, extraído de Barina et al., 2013.

La presencia de *Euphorbia davidii* en la provincia de Buenos Aires fue documentada inicialmente por Mayfield (1997) a partir de un ejemplar recogido en el partido de Olavarría; aunque este autor sostiene que esta especie es sinónimo de *Euphorbia dentata*. Por su parte Subils, que fue su descriptora original para nuestro país y a partir de sus sólidos conocimientos y fundamentos botánicos, la considera *E. davidii*. Finalmente, los últimos relevamientos realizados por Marchessi et al. (2011a) que toman en cuenta la doctrina de Subils, destacan a *Euphorbia davidii* como la especie omnipresente en el centro y sur de esta provincia.

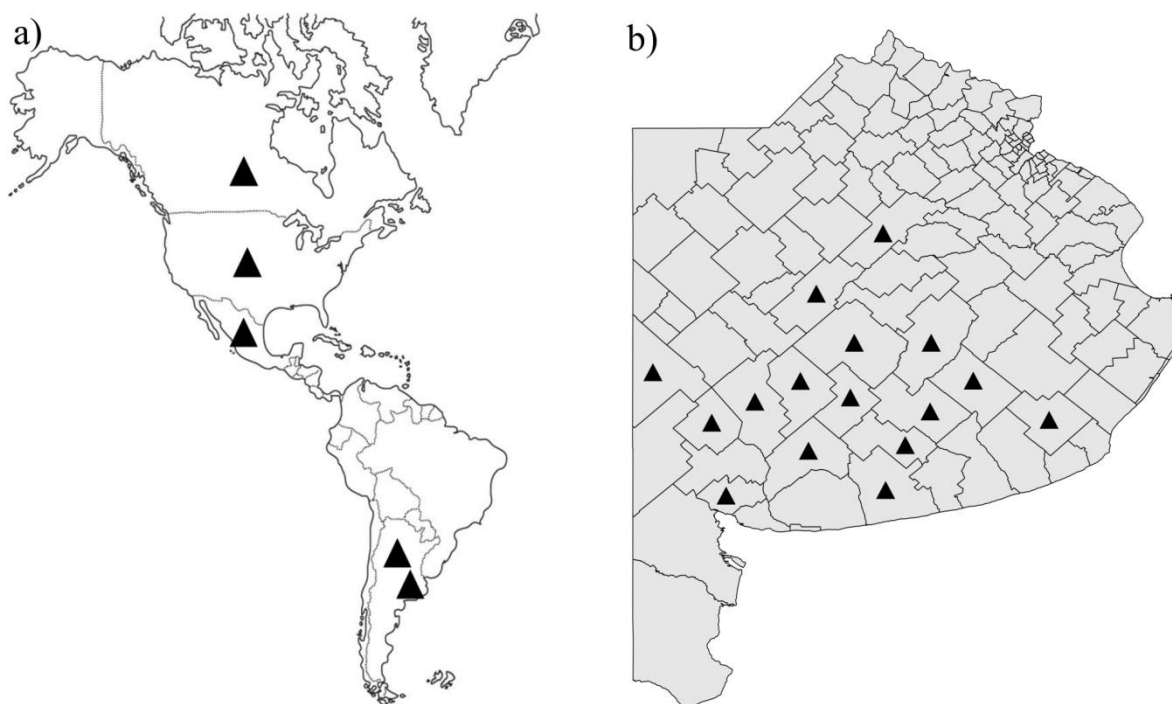


Figura 5. Distribución geográfica de *Euphorbia davidii* en el continente americano (a), y en mayor detalle en el área de estudio, zona centro de la provincia de Buenos Aires (b).

En la flora de la provincia de Buenos Aires dentro de la Sect. *Poinsettia* solo ha sido citada *E. dentata* (Dawson, 1965) y por lo tanto hasta 2010, a excepción de la obra de Mayfield (1997), todas las publicaciones hacían referencia únicamente a la presencia de *E. dentata*. Sin embargo, los relevamientos realizados en el centro y sudeste de esta

provincia convalidaron que la única especie presente en esta zona es *E. davidii*. Trabajos realizados por grupos de investigación de la Facultad de Agronomía de la Universidad Nacional del Centro de la provincia de Buenos Aires con sede en Azul, mencionan que la misma fue detectada en la zona en 1983, localizada en focos aislados y que actualmente se encuentra distribuida en el 85 % del área agrícola de ese partido. También está registrada su presencia en otros distritos: Olavarría, Tandil, Balcarce, Bolívar, 25 de Mayo, Benito Juárez, González Chaves, Laprida, General Lamadrid, Tres Arroyos, Coronel Suarez, Saavedra, Adolfo Alsina, Coronel Pringles y Bahía Blanca (Juan y Saint André, 1995; Juan et al., 1996; Marchessi et al., 2011a) (Figura 5 b). Sin embargo, no se descarta la existencia no documentada en otros partidos, como así tampoco que persistan errores de identificación confundiendo con *E. dentata*, tal como ocurrió en el sudeste bonaerense donde no fue posible hallar ni un solo ejemplar de esta última especie.

Igualmente, y a pesar de los avances en materia de clasificación taxonómica, hoy en día la polémica se mantiene, porque algunos reportes y listas de flora online no diferencian ambas especies (e.g., Jepson eFlora, 2014; PlantNET, 2017) y consecuentemente esto conlleva a confusiones y complica el intercambio de información sobre aspectos de biología y demografía de la especie, que podrían ser utilizados para diseñar estrategias de manejo.

## **5. Importancia económica y control**

En el centro de la provincia de Buenos Aires, *E. davidii* es considerada una especie altamente competitiva y de difícil control debido a la baja eficacia que presentan la mayoría de los tratamientos químicos asociado a la gran dependencia del estado fenológico de la maleza al momento del control (Juan y Saint André, 1997; Juan et al.,



2000). Esto ocasiona gran variabilidad de resultados en los tratamientos con glifosato e imazetapir cuando son aplicados en post emergencia a las dosis recomendadas (Juan y Saint André, 1997; Juan et al., 2002). En general, se observa una estrecha relación entre el estado fenológico, la dosis y los niveles de control obtenidos. Se destaca que la sensibilidad disminuye a medida que el estado fenológico avanza. Como recomendación de manejo para el control químico con glifosato se cita que el producto permite alcanzar una eficacia de control de alrededor del 90 % de las plantas presentes, cuando es aplicado a dosis de 1000 g e.a. ha<sup>-1</sup> desde la emergencia de la maleza hasta el inicio de ramificación, notándose una especial sensibilidad en el estado de 2 a 4 hojas (Juan et al., 2011).

Es recomendable evitar que la maleza llegue al estado de inicio de floración porque para obtener niveles de control aceptables serían necesarias dosis superiores a 2000 g e.a. ha<sup>-1</sup> (Juan et al., 2011). Además, en estados fenológicos avanzados se ha observado la regeneración adventicia de plantas afectadas por el herbicida, lo cual sugiere que la maleza podría metabolizar el producto y sobrevivir a los tratamientos, tal como está reportado para *E. heterophylla* (Langston et al., 1984).

El efecto de interferencia competitiva sobre soja, bajo condiciones semi-controladas de laboratorio, indican reducciones respecto del testigo libre de competencia que oscilan entre 35 al 45 % en rendimiento de granos cuando el cultivo compite con una densidad igual o mayor a 100 plantas de *E. davidii* m<sup>-2</sup> y se detectaron variaciones significativas en indicadores tales como vainas/planta, semillas/vaina, número de hojas trifoliadas y en menor medida el peso de 1000 semillas (Juan y Saint André, 1995; Juan et al., 2003).

Estudios a campo realizados en el partido de Azul a fines de la década del `90 por Juan et al. (2003), reportaron que en soja de grupo IV, 100 plantas m<sup>-2</sup> de lecherón (*Euphorbia davidii*) provocaban pérdidas de rendimiento cercanas a los 700 kg ha<sup>-1</sup>, representando más de un 30 % de reducción de rendimiento respecto del testigo desmalezado. No

obstante, se observaron efectos significativos a partir de densidades de 8 a 10 plantas  $m^{-2}$  lo cual indica una alta habilidad competitiva de la maleza. El principal componente del rendimiento afectado fue el número de vainas por planta, que registró diferencias del 15 % respecto del testigo a partir de una densidad de lecherón de 20 plantas  $m^{-2}$  (Juan et al., 2003).

En la extensa revisión realizada en el presente trabajo de tesis no se ha encontrado información específica que indique efectos alelopáticos de *E. davidii* sobre otras especies. No obstante, numerosos trabajos científicos indican que otras especies del mismo género, presentarían este fenómeno (Mola y Alvarez, 2002; Tanveer et al., 2010; Tanveer et al., 2013; Vestena et al., 2016). Por último, si bien numerosos trabajos mencionan la toxicidad del látex y aversión para rumiantes observada en otras especies de este género que invaden campos de pastoreo e.g. *E. esula* L. (Halaweish et al., 2002), no se registran datos específicos para *E. davidii*.

Si bien, aún no se han registrado biotipos resistentes a herbicidas en *E. davidii*, existen casos registrados de resistencia en una especie emparentada botánicamente, *E. heterophylla*, que además muestra cercanía geográfica con *E. davidii*. Según Heap (2016), el primer caso de resistencia en dicha especie se registró en 1990 en Ecuador al herbicida linuron. Posteriormente en 1993 y 1995 se registraron casos de resistencia a herbicidas ALS en Brasil y Paraguay respectivamente; y finalmente el último caso fue documentado en el año 2004 en Brasil, tratándose de una resistencia múltiple a herbicidas ALS y PPO. Dado que existe relativamente poca información de *E. davidii* en la bibliografía, se continuará la descripción bibliográfica utilizando el conocimiento disponible de otra Euphorbiacea ampliamente estudiada como *E. heterophylla*.

A nivel mundial, *E. heterophylla* es la especie Euphorbiacea más problemática y ampliamente estudiada. El periodo crítico de competencia de esta especie en el cultivo de

soja fue establecido entre 17 y 44 días luego de la emergencia (Meschede et al., 2002), mientras que Adelusi et al. (2006) indicaron que el período crítico libre de malezas se sitúa entre 28 a 38 días en competencia con soja.

*E. heterophylla* compite con mucho éxito con los cultivos, especialmente en las primeras etapas de establecimiento, debido a su capacidad para crecer muy rápidamente y formar un dosel denso sobre las plantas de cultivos pequeños. Es importante controlar la maleza en estados iniciales, previo a que las plantas alcancen un desarrollo avanzado, minimizando así la recarga de semillas al banco del suelo. Además, es de destacar la ocurrencia de flujos continuos de emergencia a campo de la especie durante toda la estación de crecimiento y desarrollo, dificultándose en gran medida lograr un control efectivo (Wilson, 1981).

Las pérdidas de rendimiento varían de un cultivo a otro. Por ejemplo, en soja y maní se registraron pérdidas de 30 y 50 %, respectivamente, debido a la presencia de *E. heterophylla* (Bannon et al., 1976; Nester et al., 1979; Bridges et al., 1992; Willard y Griffin, 1993). De acuerdo a Kissmann y Groth (1992), las pérdidas de rendimiento en soja debido a *E. heterophylla* puede alcanzar hasta el 80 % dependiendo de las prácticas de manejo.

Las densas poblaciones de la maleza pueden anular el rendimiento a través de la competencia, imposibilitando la recolección de la cosecha (Nester et al., 1979). Además, después de semillar, las plantas adultas de *E. heterophylla* permanecen verdes en el cultivo por 60-80 días (Egunjobi y Kupoluyi, 1973) causando graves problemas durante la cosecha. *E. heterophylla*, al igual que el resto de las Euphorbiaceae, contiene un látex blanco y pegajoso, que causa suciedad y que la vegetación se adhiera a la cosecha. Esto reduce la calidad final y también puede aumentar el contenido de humedad del grano a cosecha (Nester et al., 1979).

## **6. Potenciales usos de especies del género *Euphorbia***

El género *Euphorbia* contiene diterpenoides conocidos por sus efectos irritantes de piel como: jatropano, latirano y mirceno (Sulyok et al., 2011), tigliano, ingenano, dafnano (Jassbi, 2006), pepluano, y sesquiterpenoides; euphanginol, clovandiol, euphorbiosido A, euphorbiosido B (Shi et al., 2008), flavonoides; rutina, kaempferol, myricetina, quercetina y derivados (Noori et al., 2009), compuestos volátiles; terpineno, linalool,  $\alpha$ -terpineol,  $\beta$ -cariofileno, humuleno (Fokialakis et al., 2003), taninos (euphorbinas), triterpenoides; lupeol, lupeol acetato, betulina,  $\beta$ -amyrina y fitoesteroles;  $\beta$ -sitosterol (Patel et al., 2009). Estos constituyentes han sido aislados en diferentes partes (hojas, partes aéreas, látex, raíces y semillas) de especies del género *Euphorbia*.

En las especies de la sección *Poinsettia* a la que pertenece *E. davidii*, el látex es diferente del que poseen las especies de las restantes secciones, pues es la única que carece de triterpenos tetracíclicos y tiene predominancia de  $\alpha$ -amirina y sus ésteres (Subils, 1977). Existe un interés creciente en los diterpenos propios del género *Euphorbia* por su diversidad estructural y efectos terapéuticos. Estos compuestos han demostrado poseer efectos citotóxicos, antitumorales, antibacteriales, anti-inflamatorios y anti-HIV (Jassbi, 2006; Shi et al., 2008; Demirkiran et al., 2011).

Algunas especies del género *Euphorbia* se destacan por la producción de sustancias aleloquímicas como compuestos fenólicos, diterpenos y otras, que actúan contra insectos, nematodos, hongos, bacterias y moluscos, indicándose que podrían ser de interés para el potencial desarrollo de productos de origen biológico para el manejo de organismos perjudiciales en cultivos (Tanveer et al., 2013). Se han encontrado propiedades antibacteriales en extractos de *E. guyoniana* Boiss. & Reut. (El-Bassuony, 2007), *E.*

*heterophylla* (Falodun et al., 2008); anti-virales en *E. thymifolia* (Lin et al., 2002), y *E. hyberna* L. (Bedoya et al., 2009), anti- fúngicas en *E. nivulia* Buch.-Ham (Annapurna et al., 2004), *E. hirta*, y *E. tirucalli* (Mohamed et al., 1996); nematocidas en *E. tirucalli*, *E. helioscopia*, *E. splendens* Bojer. Ex Hooke., y *E. pulcherrima* Willd. Ex Klotzsch (Devi y Gupta, 2000); molusquicidas en *E. conspicua* (Dos Santos et al., 2007), y *E. paralias* L. (Abdelgaleil et al., 2002); e insecticidas en *E. hirta* (Liu et al., 2007).

Actualmente, solo se reportan datos de usos potenciales de *E. davidii* a partir de la extracción de tres glucósidos flavonoides que están siendo evaluados para el tratamiento de distintos tipos de cáncer de piel, útero, ovario y mama (Rédei et al., 2015). Por otra parte, queda claro que siendo el látex una sustancia ampliamente utilizada en la industria, se pueda especular sobre posibles extracciones con fines comerciales. En algunas especies de *Euphorbia* relacionadas como *E. tirucalli* L. se han observado posibilidades de uso para el desarrollo de biocombustibles (Khaleghian et al., 2011). En este sentido, desde el año 2010 Repsol España cuenta con un proyecto para desarrollar biocombustibles a partir de *E. lathyris* (Repsol, 2016). Cabe mencionar además que Coutinho et al. (2016), destacan el potencial uso de siete especies de Euphorbiaceas, cómo biocombustible, jabones, detergentes, componentes para pinturas, barnices y lubricantes industriales. Por otro lado, dado que se desconoce el valor económico de la mayoría de los germoplasmas de especies silvestres, es probable que muchas características provenientes del genoma de esta especie puedan ser utilizadas en el futuro.

## **7. Hipótesis y objetivos**

En función de la problemática planteada y en relación a la revisión bibliográfica y la experimentación previa efectuada sobre *E. davidii* se plantearon las siguientes hipótesis:

H1: *Euphorbia davidii* es una especie invasiva en la zona centro de la provincia de Buenos Aires, con capacidad para establecer bancos de semillas persistentes y generar varias cohortes de individuos al año.

H2: Existen biotipos de *Euphorbia davidii* con resistencia al herbicida glifosato.

H3: La disponibilidad de ciertos nutrientes minerales en el suelo afectan el control químico de *Euphorbia davidii* con glifosato.

## **8. Objetivos generales**

G1: Estudiar el efecto de las prácticas de manejo de la región centro de la provincia de Buenos Aires y su impacto sobre la dinámica poblacional de *E. davidii*.

G2: Evaluar la existencia de poblaciones con sensibilidad diferencial al herbicida glifosato.

G3: Evaluar la influencia del estado nutricional en el control químico de *E. davidii*.

## **9. Objetivos particulares**

P1: Evaluar el banco de semillas de *Euphorbia davidii* en la zona centro de la provincia de Buenos Aires.

P2: Evaluar la germinación y viabilidad de las semillas de *Euphorbia davidii* extraídas de diferentes estratos de profundidad del suelo.

P3: Analizar la dinámica poblacional de *Euphorbia davidii* mediante el seguimiento de cohortes.

P4: Establecer una escala de tiempo térmico para predecir la ocurrencia de distintas etapas fenológicas.

P5: Comparar la sensibilidad de diferentes poblaciones de *Euphorbia davidii* al herbicida glifosato.

P6: Evaluar el efecto del nivel de fósforo y azufre en el suelo, en la eficiencia de control de *Euphorbia davidii* con glifosato.

## **CAPITULO II**

# **EVALUACIÓN DEL BANCO DE SEMILLAS DE *Euphorbia davidii* EN LOTES AGRÍCOLAS DE LA PROVINCIA DE BUENOS AIRES (\*)**

(\*) Parte de la información incluida en este capítulo ha sido publicada: Núñez Fré, F.R.; Juan, V.F. y Chantre, G.R. (2014). Distribución vertical del banco de semillas de *Euphorbia davidii* Subils en lotes agrícolas de la zona centro de la Provincia de Buenos Aires, Argentina. *Planta Daninha* **32(4)**, 709-718.



## **1. Introducción**

El término banco de semillas ha sido adoptado para designar reservas de semillas viables en la superficie del suelo y en profundidad (Roberts, 1981), que son capaces de reemplazar las plantas adultas que desaparecieron por causas naturales o antrópicas (Baker, 1989). En suelos agrícolas, los bancos de semillas constituyen la principal fuente de renovación y perpetuación de las malezas anuales (Cavers y Benoit, 1989).

La información del banco de semillas de comunidades de malezas se obtiene mediante sucesivos muestreos a distintas profundidades del perfil del suelo. Dada la complejidad, lentitud y lo tedioso de dicha metodología (Gonzalez y Ghermandi, 2012) existe escasa información al respecto. Además del tiempo y el costo que representan dichos muestreos, quizás uno de los principales factores que incrementan la dificultad de este tipo de investigaciones, es el tipo de distribución espacial que presentan las especies de malezas. A nivel de lote a menudo están distribuidas en manchones, evidenciándose la recurrencia de las especies en los mismos sitios a lo largo del tiempo (Clark et al., 1996). Las causas que originan este tipo de distribución pueden estar asociadas a los mecanismos de dispersión y/o a la heterogeneidad de factores ambientales y culturales (Matteucci y Colma, 1982). Por ende, es común en un muestreo encontrar un gran número de muestras sin semillas y pocas unidades con alta concentración de propágulos. De acuerdo con Forcella et al. (2004), el modelo espacial de los bancos de semillas sigue una distribución binomial negativa, lo que significa que esta agregación está influenciada por la densidad, es decir, conforme aumenta la densidad el nivel de agrupación disminuye.

Las semillas de las malezas están en constante redistribución, desplazándose tanto en forma horizontal como vertical. La distribución horizontal obedece a la micro-topografía y a vectores bióticos (aves, mamíferos) y abióticos (viento y precipitaciones). La

distribución vertical obedece principalmente a las labores culturales, la macro y micro fauna del suelo (Clements et al., 1996) entre otros factores. La profundidad de muestreo se define en función del tipo de vegetación presente y el objetivo de la investigación. En los suelos cultivados se recomienda tomar muestras a la profundidad de siembra de los cultivos. En esta zona se concentra alrededor del 90% del banco de semillas (primeros 20 cm), evidenciándose una disminución de la densidad a medida que aumenta la profundidad, dependiendo el patrón de reducción del tipo de labranza (Fernández-Quintanilla, 1988; Yenish et al., 1992; López Granados y García Torres, 1993).

La metodología para el estudio de los bancos de semillas, no tiene una definición exacta con respecto al número y/o volumen de suelo a ser muestreado. Generalmente, el costo del muestreo y los recursos disponibles como tiempo, espacio y trabajo físico, definen el criterio más adecuado a adoptar en cuanto al número y tamaño de las muestras (Benoit et al., 1989). Kropác (1966) señala como lineamiento general, que es más ventajoso tener un gran número de pequeñas muestras, que un pequeño número de muestras más grandes. En especies anuales, los individuos que emergen representan solamente una proporción de las semillas presentes en el suelo, pero en general, existe una relación directa entre la abundancia de las especies en el lote y la abundancia de sus propágulos en el banco de semillas (Silvertown, 1982). La germinación de semillas en el suelo, resulta del balance entre condiciones ambientales favorables y características intrínsecas de estos órganos de reproducción. Particularmente, la dormición es uno de los principales mecanismos de preservación de las malezas, distribuyendo la germinación y la emergencia a lo largo del tiempo y el espacio (Carmona, 1992), aumentando las probabilidades de supervivencia y perpetuación de dichas especies (Mc Ivor y Howden, 2000).

Por su parte la supervivencia de las semillas se encuentra afectada por la acción de los predadores, microorganismos, germinación fallida, muerte fisiológica, y las condiciones

adversas del suelo que pueden afectar negativamente la viabilidad de las mismas (ej. profundidad de entierro) (Booth et al., 2003).

Desde el reconocimiento de estos mecanismos de dormición, se consideran dormidas a las semillas cuyas características morfológicas, fisiológicas o físicas impiden la germinación bajo condiciones ambientales óptimas (Villiers, 1972). Según Benech-Arnold et al. (2000), la dormición es un proceso intrínseco de la semilla determinado por uno o más factores internos que impiden la germinación en condiciones térmicas, hídricas y gaseosas adecuadas.

Las especies silvestres generalmente tienen mecanismos de dormición, mientras que las especies cultivadas más comunes fueron perdiendo estos mecanismos durante el proceso de selección y domesticación, lo que resulta en variedades modernas con poca o ninguna dormición. Harper (1957) introdujo los términos de dormición innata (primaria) e inducida (secundaria) para caracterizar el desarrollo de la dormición a partir de la planta madre o después de la separación de la misma, respectivamente. La dormición primaria impide la germinación en la planta madre y en semillas recién dispersadas, variando su intensidad con el genotipo, el ambiente y la interacción genotipo x ambiente durante la fase de maduración en la planta madre (Fenner, 1991). Tanto la dormición innata como la inducida, normalmente son afectadas por las condiciones ambientales.

Para comprobar la viabilidad y germinación de las semillas extraídas del suelo es necesario aplicar pruebas de laboratorio específicas. Las mismas permiten determinar en una muestra dada la proporción de semillas viables y capaces de producir plántulas normales en condiciones favorables. Este tipo de prueba es válida para especies cultivadas de interés económico. Sin embargo, cuando se trabaja con especies nativas o malezas, los resultados son más complejos de interpretar debido a la presencia del mecanismo de dormición ya mencionado (Eira et al., 1998; Carvalho y Nakagawa, 2000). Otra

característica importante es la viabilidad de las semillas, que define la capacidad potencial de germinar durante períodos variables de tiempo. Las condiciones de almacenamiento y factores ambientales tienen un efecto decisivo sobre la viabilidad de cualquier especie (Malavasi, 1988). La prueba de TTC (Cloruro de trifetil tetrazolio), es el test más difundido para determinar viabilidad con amplia difusión internacional (ISTA, 2011). Sin embargo, presenta ciertos inconvenientes como el costo, tiempo y variabilidad de las estructuras morfológico-anatómicas de muchas semillas de malezas que pueden dificultar una estimación rápida y eficiente de la viabilidad de las mismas (Borza et al., 2007).

El tamaño y la composición de una población de semillas en el suelo en un momento dado es el resultado de un equilibrio entre las entradas y pérdidas (germinación, daños, parásitos, depredadores y transporte por varios agentes). La densidad y conformación temporal del banco de semillas dependerá de la especie, dormición, condiciones ambientales, presencia de depredadores y microorganismos, etc. A nivel de comunidad, la dinámica de los bancos de semillas dependerá de las particularidades de las distintas especies de cada comunidad y entre comunidades. Por lo general, la función principal de pérdida del banco está dada por la germinación (Parker et al., 1989). El periodo de germinación y emergencia característico de cada especie identifica la estrategia de regeneración. Thompson y Grime (1979) caracterizaron como bancos de semillas transitorios, a aquellos cuya germinación se produce en un plazo máximo de un año después de la dispersión y como persistentes, aquellos cuya germinación supera este período. Los bancos persistentes se caracterizan por el predominio de semillas pequeñas, livianas, con dormición y sin mecanismos de dispersión o defensas químicas específicas. Son favorecidos en condiciones de alto riesgo ambiental para la supervivencia de las especies maleza (Parker et al., 1989), y las semillas de estos bancos suelen atraer menos predadores comparativamente con las semillas de mayor tamaño características de los

bancos de corta duración, debido a que estas últimas suelen tener mayor contenido de energía (Louda, 1989).

En los suelos cultivados, los bancos persistentes normalmente constituyen un problema serio para la agricultura ya que garantizan la infestación de malezas durante un largo período de tiempo, incluso cuando se impiden las nuevas entradas de semillas en la zona. Esto conduce a la disminución en el rendimiento y calidad del producto cosechado, así como un aumento de los costos de producción.

A nivel mundial el control químico es la principal estrategia de control de malezas (Christoffoleti, 2004). Sin embargo, la necesidad de disminuir el impacto ambiental y a fin de poder satisfacer la creciente demanda social en cuanto a la inocuidad alimentaria y la reducción del uso indiscriminado de agroquímicos, ha surgido una propuesta alternativa sustentable basada en el Manejo Integrado de Malezas (MIM) (Dessaint et al., 1996).

El estudio del banco de semillas de malezas es entonces necesario a fin de entender y simular el comportamiento demográfico con miras al establecimiento de programas de MIM (Ambrosio et al., 2004). Proveen también información ecológica de la dinámica poblacional, permite reflejar el éxito o fracaso de las medidas de control, y anticipar los niveles de infestación y la diversidad de las infestaciones en un campo de cultivo (Forcella et al., 2004). De hecho, las investigaciones en esta área han servido de guía para el manejo de malezas y podrían ser aplicadas al manejo de especies invasoras (Holt, 2004).

El estudio de los bancos de semillas en suelos cultivados es de gran importancia para la agricultura, ya que permitiría la construcción de modelos de dinámica temporal y espacial, lo que facilitaría el ajuste de las estrategias y programas de control (Martins y Silva, 1994). El conocimiento de las tasas de emergencia de especies de malezas, por

ejemplo, se puede utilizar para ajustar gestiones del suelo y del cultivo, racionalizando el uso de herbicidas (Voll et al., 1996).

Actualmente existen pocos estudios de bancos de semillas de las principales malezas en la Argentina. Considerando que *E. davidii* representa una de las principales especies invasoras en lotes agrícolas de la región central de la provincia de Buenos Aires, se plantean los siguientes objetivos: cuantificar la abundancia, distribución vertical y viabilidad de las semillas en el banco del suelo en lotes donde se desarrolla agricultura continua, bajo dos sistemas de manejo (siembra directa continua e interrumpida por labranza), en la zona centro de la provincia de Buenos Aires, Argentina.

## **2. Materiales y métodos**

### *Cuantificación y distribución vertical del banco de semillas*

Durante los años 2012 y 2014, se realizaron estudios a campo en dos lotes agrícolas ubicados en el centro de la provincia de Buenos Aires, Argentina. Dichos lotes fueron seleccionados por haber sido utilizados para agricultura en forma continua en el período (2000-2014) y por presentar una alta densidad de la maleza, que de acuerdo a los relevamientos previos superó las 500 plantas m<sup>-2</sup> por año, lo cual evidencia las dificultades de control por parte de productores utilizando glifosato como principal herbicida.

El lote de Olavarría se encuentra ubicado en la localidad de Sierras Bayas (240 m.s.n.m., 36°58'0.99"; 60°11'49.68"O) y el sistema de labranza utilizado durante la última década fue siembra directa continua; mientras que en el lote de Azul (148 m.s.n.m., 36°50'8.75"S

y 59°52'20.23"O) también bajo sistema de siembra directa, se realizaron labranzas con disco en 2009 y 2013.

El muestreo de cada lote consistió en la recolección de 240 muestras de suelo provenientes de 60 puntos distribuidos al azar, extraídas mediante un barreno. Las unidades de muestreo estuvieron representadas por cilindros de suelo de 8 cm de diámetro por 5 cm de alto, tomados a 4 niveles de profundidad: 0-5, 5-10, 10-15 y 15-20 cm. El suelo muestreado fue caracterizado como Argiudol típico, con textura franco arcillosa.

Las extracciones se realizaron dos veces al año; la primera durante el mes de mayo, luego de la dispersión de semillas, y la segunda en septiembre antes que comenzara la germinación en condiciones de campo.

Las muestras de suelo extraídas fueron almacenadas hasta su procesamiento a temperaturas menores a 15 °C y en oscuridad, para prevenir la germinación de los propágulos durante el almacenamiento.

La separación de la totalidad de los propágulos de las muestras de suelo se realizó en laboratorio, utilizando la técnica de tamizado en húmedo, que consistió en colocar las mismas sobre un tamiz malla 18 (tamaño de abertura 1000 micrones), bajo un flujo de agua constante, para desagregar el suelo, identificar y juntar las semillas de la especie en estudio.

La cantidad de semillas proveniente de cada una de las dos extracciones anuales realizadas, en cada uno de los lotes relevados y de cada estrato de suelo, fueron registradas en forma independiente y los resultados fueron sometidos a análisis de varianza, en un diseño completamente al azar, las medias fueron separadas en base a la diferencia mínima significativa, con el test de Tukey con un nivel de probabilidad  $p \leq 0,05$ ; utilizando el software estadístico InfoStat versión 2012 (Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina).

### *Evaluación de la germinación y viabilidad del banco de semillas*

A partir de las semillas obtenidas en la experiencia anterior, se realizaron ensayos para evaluar la germinación y la viabilidad.

Para esto, cuatro muestras de 30 semillas de cada localidad y cada profundidad, fueron dispuestas en placas de Petri sobre papel de filtro humedecido con agua destilada y colocadas en cámara de germinación a 18 °C (Marchessi et al., 2011b). Se realizaron recuentos del número de semillas germinadas cada 3 días, durante un período de 21 días. Las semillas que no germinaron se sometieron al test de viabilidad, mediante la prueba de 2,3,5-Trifenil tetrazolio (Perry, 1984). La viabilidad total de cada muestra se calculó en base a la cantidad de semillas germinadas en la primera evaluación, adicionando las que dieron resultado positivo de viabilidad en la prueba del tetrazolio.

Los datos de germinación y viabilidad se procesaron estadísticamente, en un diseño completamente al azar con cuatro repeticiones, las medias fueron separadas en base a la diferencia mínima significativa, con el test de Tukey con un nivel de probabilidad  $p \leq 0,05$ ; utilizando el software estadístico InfoStat versión 2012 (Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina).

### **3. Resultados y discusión**

Sobre el total de semillas cuantificadas en cada sitio, se observó que en el lote ubicado en la localidad de Olavarría, con más de 10 años de siembra directa continua, se recolectaron más de 11000 semillas  $m^{-2}$  de 0 a 20 cm en las dos épocas de muestreo. En las muestras de suelo provenientes del lote localizado en Azul, en el que el manejo estuvo interrumpido



por labranzas, se cuantificaron aproximadamente 23000 semillas  $m^{-2}$  en el muestreo de mayo y 28000 semillas  $m^{-2}$  en septiembre, registrándose diferencias significativas respecto a lo detectado en Olavarría en ambos momentos de muestreo (Tabla 2).

En este último caso, teniendo en cuenta que la principal vía de dispersión de *E. davidii* es la dehiscencia elástica de los frutos y que los propágulos son relativamente grandes y carentes de órganos de dispersión anemócora, es poco probable que haya existido un aporte significativo de semillas de otros sitios. Posiblemente durante el primer muestreo de mayo, pudo haber existido un remanente de semillas en cápsulas sobre las plantas de *E. davidii*, o bien, algunas cápsulas pudieron caer al suelo sin abrirse omitiéndose esa fracción de semillas no dispersadas.

Tabla 2. Cantidad total de semillas de *Euphorbia davidii* recolectadas sobre muestras de suelo de 0 a 20 cm de profundidad en lotes agrícolas de Olavarría y Azul, provincia de Buenos Aires (2012 y 2014). Los valores seguidos de una misma letra no difieren significativamente entre sí (test de Tukey,  $p \leq 0,05$ ).

<b>Localidad</b>	<b>Mayo (semillas <math>m^{-2}</math>)</b>	<b>Septiembre (semillas <math>m^{-2}</math>)</b>
Olavarría	11549 b	12465 b
Azul	22950 a	27832 a

Por otro lado, si bien existe variación en la distribución horizontal del banco de semillas, es poco probable que este factor explique la diferencia observada, ya que en ambas fechas se tomaron 60 puntos de muestreo al azar en un mismo sector del lote y analizando las variaciones entre ambos muestreos por estrato, se aprecia que en Azul existió un incremento de aproximadamente un 25% en el estrato 0-5 cm (Tabla 3), y esto se corresponde con un incremento de una magnitud similar en la cantidad total de semillas de septiembre comparado con mayo en esa misma localidad (Tabla 2).

Tabla 3. Cantidad total de semillas de *E. davidii* m<sup>-2</sup> recolectadas sobre muestras de suelo de 0 a 5, 5 a 10, 10 a 15 y 15 a 20 cm de profundidad en lotes agrícolas de Olavarría y Azul, provincia de Buenos Aires. Los valores seguidos de una misma letra no difieren significativamente entre sí (test de Tukey, p ≤0,05).

Prof. (cm)	Olavarría		Azul	
	Mayo	Septiembre	Mayo	Septiembre
0 a 5	9297 a	9072 a	12356 a	15415 a
5 a 10	1489 b	1895 b	6527 b	6565 b
10 a 15	536 bc	952 bc	3204 c	4547 c
15 a 20	227 c	546 c	854 d	1305 d

En estudios realizados sobre el banco total de semillas de la comunidad de malezas sobre un lote agrícola del partido de Azul en el año 2000, se encontró que la densidad total de semillas varió entre 20000 y 60000 semillas m<sup>-2</sup>. Ese estudio reflejó la existencia de una co-dominancia de tres especies más abundantes del banco de semillas *Chenopodium album*, *Amaranthus quitensis* y *Digitaria sanguinalis*, que representaron el 27,2; 21,1 y 20,2 % del banco de semillas, respectivamente; y la única Euphorbiacea que se menciona de importancia es *Euphorbia serpens* (Requesens et al., 2004).

Si bien en el trabajo de referencia no se menciona la presencia de *E. davidii*, es importante destacar que los presentes estudios se realizaron en lotes bajo agricultura continua, con altas infestaciones de la maleza y en estos se encontró una cantidad de semillas de esta especie similar al banco total de semillas determinado en el estudio anterior. Por otro lado, se destaca la evolución ocurrida en la composición florística de malezas de la región en la última década durante la cual *E. davidii* ha incrementado tanto su presencia como su abundancia (Juan et al., 2011) evidenciando claramente la capacidad invasiva y colonizadora de esta especie.

El manejo tradicional de malezas basado en el control químico supone que existe un umbral, que es definido como la densidad de malezas en la que el costo del control es equivalente al valor del rendimiento del cultivo salvado por ese control (Cousens, 1987). Debido a este razonamiento, habrá densidades de malezas que no afectarían el rendimiento del cultivo en forma significativa como para justificar la aplicación de un herbicida, desde el punto de vista económico; por lo tanto, cierto nivel de densidad de malezas permanecería en el campo, y llevarían a un incremento en la magnitud del banco de semillas (Hartzler, 1996).

Un incremento en el tamaño del banco de semillas dificultará los programas de manejo de malezas, debido a que una alta densidad inicial puede llevar a que exista un elevado remanente de individuos, aún luego de la aplicación de un control químico con una efectividad superior al 85% (Taylor y Hartzler, 2000), llevando a la necesidad de recurrir a un nuevo tratamiento u otra alternativa de control.

En la Tabla 4 se presentan los resultados de la distribución vertical de semillas en forma porcentual respecto del total de propágulos recolectados en ambas localidades. Para el lote de la localidad de Olavarría en los muestreos realizados en mayo, se observó que más del 79% de los propágulos se encontraron en los primeros 5 cm del suelo, lo cual resulta previsible por la forma de dispersión de las semillas y la reciente dehiscencia de las cápsulas que, en general, se produce durante los meses de marzo y abril. En este sentido, en relevamientos realizados en siembra directa para diversas malezas, se encontró que entre el 60 y 99% de las semillas se ubicaban a profundidades de 0-5 cm (Ghersa y Martínez-Ghersa, 2000).

En el segundo estrato muestreado (5-10 cm) se cuantificaron menos de 2000 semillas  $m^{-2}$ , que representó alrededor del 14% del total y, el 7% restante se encontró en los dos estratos más profundos entre los 10 y 20 cm de suelo.

Tabla 4. Distribución vertical de las semillas de *E. davidii* encontradas hasta los 20 cm de profundidad, en porcentaje respecto del total cuantificado, para los dos sitios muestreados en mayo y septiembre (años 2012 y 2014). La comparación se realiza dentro de cada localidad. Los valores seguidos de una misma letra no difieren significativamente entre sí (test de Tukey,  $p \leq 0,05$ ).

Profundidad (cm)	Olavarría		Azul	
	Mayo	Septiembre	Mayo	Septiembre
0 - 5	79,34 a	71,4 a	51,95 a	53,04 a
5 - 10	13,76 b	16,63 b	29,82 b	25,93 b
10 - 15	4,62 c	7,66 c	15,03 c	16,26 c
15 - 20	2,28 c	4,31 c	3,2 d	4,77 d
DMS	6,81		4,79	

En el muestreo realizado a los 5 meses de producida la dehiscencia (septiembre), se obtuvieron resultados similares. Los estratos superficiales contuvieron el 70% y 15% de las semillas, diferenciándose entre sí y a su vez de los estratos más profundos (Tabla 4). No obstante, el primer estrato registró en septiembre una disminución de un 8% respecto de la cantidad registrada en mayo y, a su vez se observó un sutil incremento, entre el 2-3% en los tres estratos establecidos entre los 5 y los 20 cm. La reducción en el número de propágulos del estrato superficial, puede ser atribuida al enterrado de las semillas por el arrastre que ocasiona el agua, a medida que ingresa en el suelo luego de las lluvias, como así también a la actividad de la macrofauna del suelo, incluyendo a las hormigas.

Es importante destacar que, en el caso de siembra directa continua, la mayor proporción de las semillas presentes cerca de la superficie sufrirán un mayor riesgo de predación, envejecerán más rápidamente y presentarán tasas de mortalidad incrementadas por germinación fallida bajo condiciones medioambientales desfavorables (Ballaré et al.,

1988). Por otra parte, en periodos de sequía, las grandes grietas formadas en el suelo podrían generar la caída de las semillas en capas más profundas del suelo (Ghersa y Martinez-Ghersa, 2000). Este fenómeno es posible que explique en parte la disminución de la cantidad de semillas en el estrato superficial y la tendencia a un incremento en las capas más profundas.

La disminución en el número de semillas entre ambos muestreos, también puede deberse en parte al transporte secundario mediado por hormigas. Existen numerosos trabajos donde se menciona la interacción entre semillas de especies de la familia de las Euphorbiaceas y hormigas. Dentro de los principales factores bióticos de migración de semillas de Euphorbiaceas (incluyendo roedores y aves), las hormigas son ampliamente el factor más influyente. Esa migración ocurre tanto por transporte secundario hasta los hormigueros, como por predación de las mismas (Espadaler y Gómez, 1996). La presencia de un elaiosoma, es un factor importante en la interacción hormiga-semilla; dado que aquellas semillas que cuentan con el mismo, tienen una probabilidad siete veces mayor de ser transportadas a los hormigueros por hormigas no predatoras. Lo anterior sustenta la teoría de que la mirmecocoria es una estrategia para evitar predadores de semillas (Espadaler y Gómez, 1997).

En cuanto a la distribución vertical del lote ubicado en la localidad de Azul (Tabla 4), se observa que independientemente del momento de muestreo en los primeros 5 cm de suelo se encontraron alrededor del 50% de los propágulos con respecto al total relevado, más de un 25% se ubicó entre los 5 y 10 cm de profundidad, aproximadamente el 16% en el estrato de 10 a 15 cm y alrededor de un 4% entre los 15 y 20 cm de suelo muestreado. Es notable destacar que todos los estratos se diferenciaron estadísticamente de los restantes, mostrando ese mismo comportamiento en ambas fechas evaluadas.

De la comparación de las dos fechas de muestreo se observa que solamente existió un aumento destacable en el número de semillas para el primer estrato de 0 a 5 cm (Tabla 3), de igual forma que en el número total de propágulos presentado en la Tabla 2, registró un incremento en la cantidad de semillas en el muestreo de septiembre con respecto al relevamiento previo de mayo.

Como se había mencionado anteriormente, esta diferencia puede explicarse en primer lugar, debido a un remanente de semillas en cápsulas sobre las plantas de *E. davidii*, o por cápsulas que cayeron al suelo conteniendo semillas. Otro factor a considerar, podría ser una menor predación de semillas, que usualmente ocurre en sitios donde hay disturbios como labranzas (Ballaré et al., 1988). Sumado a este efecto de menor predación, podría haber ocurrido un menor transporte por parte de las hormigas, por destrucción de hormigueros durante la labranza. Dentro de los factores bióticos que podrían influir, también se podría destacar el aporte de semillas desde otros sitios que hayan sido consumidas por aves y eliminadas junto con el guano. Existen diversos trabajos en donde se ha evaluado la dispersión de semillas de Euphorbiaceas por diferentes especies de aves (Blockstein et al., 1987; Wald et al., 2005) en los cuales se puede apreciar que este factor, si bien puede contribuir al proceso de dispersión, es de una importancia secundaria.

Otro factor que resta considerar, es el arrastre de semillas de *E. davidii* sobre el suelo luego de una lluvia. Al tratarse de semillas de un tamaño de 2-2,5 mm, es probable que puedan ser arrastradas por una lluvia de moderada intensidad; con lo cual se daría una dispersión secundaria de semillas, y estas podrían incorporarse a las posiciones más bajas del paisaje.

Comparando la distribución vertical para los dos sitios en estudio, en la Tabla 4 se puede observar la influencia de la labranza realizada en el lote de Azul, sobre la distribución vertical de las semillas en el perfil.

En el sitio ubicado en Olavarría, con una década de agricultura en siembra directa, la mayor parte de las semillas está posicionada superficialmente. Del total de semillas recolectadas en este lote, alrededor de 12000 propágulos  $m^{-2}$ , más del 75% se encontraron en los primeros 5 cm del suelo, mientras que en Azul más del 50% de los 28000 propágulos  $m^{-2}$  extraídos, se encontraron en este estrato, independiente del momento del muestreo. Esta tendencia, también se manifestó en profundidades de 5 a 10 cm y de 10 a 15 cm, donde resulta notorio el impacto de la labranza. En el presente trabajo se encontraron diferencias en la distribución de las semillas en el suelo, luego de solo dos años de labranza, incluso considerando que el tamaño de las semillas de *E. davidii* es relativamente grande.

Carter e Ivany (2006) detectaron diferencias en la distribución de las semillas de malezas en el suelo y encontraron interacción entre el sistema de labranza y el tamaño de la semilla. En este trabajo, donde se evaluaron sistemas de labranza profunda, superficial y siembra directa, se observaron cambios más notorios en las especies de semillas más pequeñas como *Gnaphalium uliginosum* (0,5 mm) y *Chenopodium album* (1 mm), en contraste con propágulos de *Ranunculus repens* (3 mm). Esto se corresponde con los estudios realizados por Clements et al. (1996) quienes sugieren que el efecto de la labranza es dependiente de la especie de la maleza y está relacionado principalmente con el tamaño de la semilla.

Comparando labranzas mínimas y tradicionales, Ekeleme et al. (2005), encontraron que para *Euphorbia hyssopifolia* y *E. heterophylla*, el número de propágulos en el suelo no resultó afectado por el sistema de labranza utilizado. La distribución de las semillas en los diferentes estratos observada en Azul, donde el suelo fue laboreado, puede ser explicada en términos de probabilidad de movimiento de semillas a lo largo del perfil del suelo. Según los estudios realizados por Mohler et al. (2006), la probabilidad de que

después de una labranza las semillas superficiales se ubiquen a más de 10 cm es superior al 70%, mientras que la probabilidad de traer a la superficie semillas que se encontraban inicialmente a 14-18 cm, es de sólo un 40%. De esto se deduce, que una labranza profunda tiene un efecto neto de transporte de semillas superficiales a profundidades mayores a 10 cm.

Evaluando la respuesta de la germinación en las semillas de la localidad de Olavarría, se encontraron diferencias entre los dos momentos de muestreo evaluados (Figura 6).

Las semillas extraídas en mayo, el estrato superficial (0-5 cm), presentaron un bajo porcentaje de germinación (<25%), mientras que en la muestra de 10-15 cm superaron el 50 % de germinación y se diferenciaron estadísticamente de las superficiales. La muestra de 5-10 cm, también presentó baja germinación (<35%), aunque no se diferenció estadísticamente del resto.

Las semillas extraídas en septiembre desde 0 hasta los 10 cm de profundidad no presentaron diferencias significativas, obteniéndose una germinación superior al 70%, diferenciándose de la muestra de 10-15 cm con una germinación de un 65%, y a su vez también de la más profunda (15-20 cm) que solo logró una germinación de alrededor del 40%.

Estos cambios en el porcentaje de germinación pueden deberse a los propios ciclos de dormición de las semillas, como así también a diferentes factores que influyen en la germinación: intensidad lumínica, fotoperiodo, luz, temperatura y sus fluctuaciones, nitratos, niveles de O<sub>2</sub>, CO<sub>2</sub>, pH, humedad y abrasión física de la cubierta seminal son algunos de ellos (Silvertown, 1982).



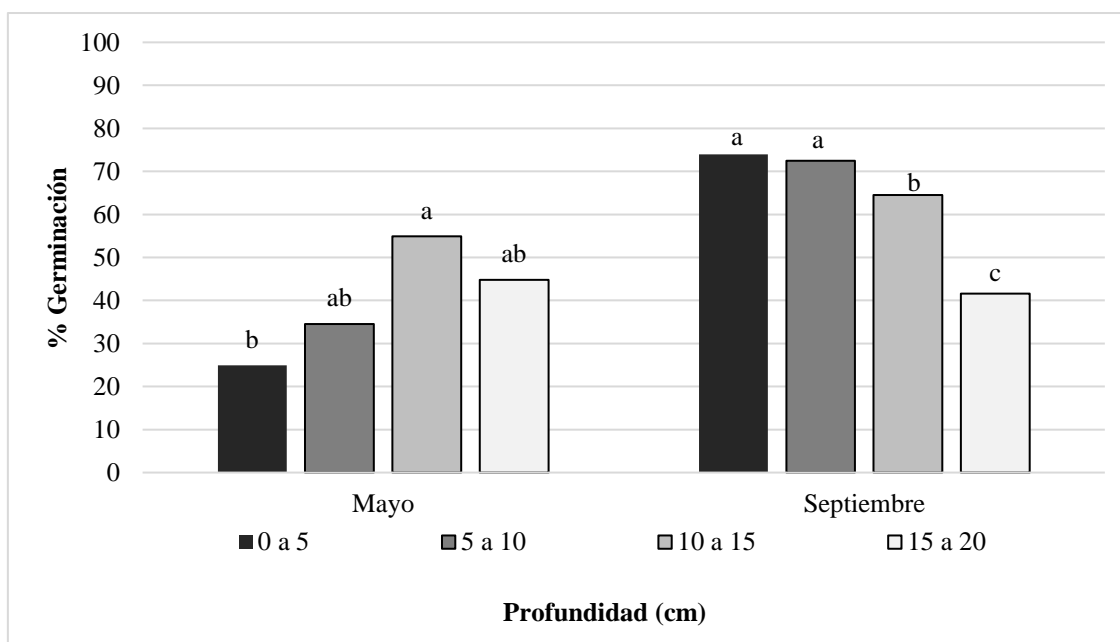


Figura 6. Porcentaje de germinación, en laboratorio, de semillas de *E. davidii*, extraídas de 4 estratos de profundidad en un lote agrícola de Olavarría, en mayo y septiembre (2012 y 2014). Las comparaciones son sólo válidas dentro de cada momento de muestreo. Letras iguales indican que no existen diferencias significativas entre sí (test de Tukey,  $p \leq 0,05$ ).

La temperatura es un requisito importante para la superación de la dormición y puede interferir en los flujos anuales de emergencia de malezas (Benech-Arnold et al., 1988). En el banco de semillas del suelo la temperatura es el principal factor regulador de los cambios en la dormición de las semillas. En las regiones de clima templado suelen existir requerimientos de fluctuaciones diurnas y estacionales, que ayudan a aliviar la dormición o favorecen la reinducción a la dormición secundaria según la especie considerada (Forcella, 1998).

Sobre las muestras de suelo recolectadas en el lote de Azul, en el muestreo de mayo, el mayor porcentaje de germinación (~70%) se obtuvo a partir de las semillas extraídas de 0 a 5 cm, que se diferenciaron de las extraídas en el resto de los estratos. La germinación en los estratos de 5 -20 cm presentó valores entre 46 y 50% aunque no se diferenciaron estadísticamente entre sí (Figura 7).

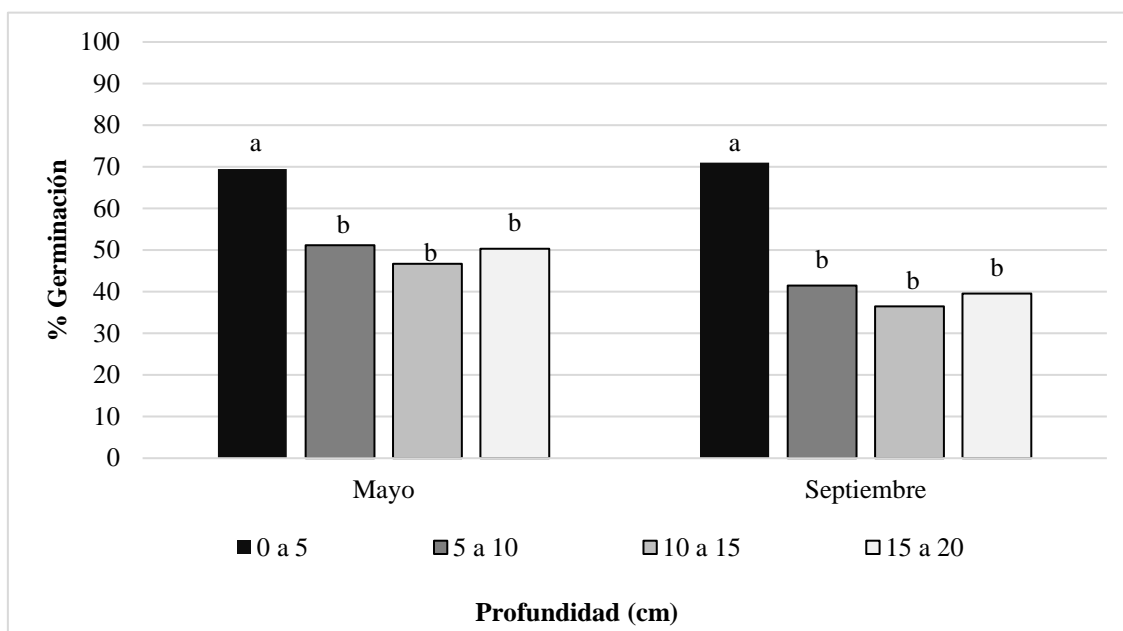


Figura 7. Porcentaje de germinación, en laboratorio, de semillas de *E. davidii*, extraídas de 4 estratos de profundidad en un lote agrícola de Azul, en mayo y septiembre (2012 y 2014). Las comparaciones son sólo válidas dentro de cada momento de muestreo. Letras iguales indican que no existen diferencias significativas entre sí (test de Tukey,  $p \leq 0,05$ ).

En las semillas provenientes de las muestras de suelo recolectadas en septiembre, al igual que en el caso anterior, las semillas superficiales (0-5 cm) obtuvieron el 70% de germinación, diferenciándose estadísticamente del resto de las profundidades. Las semillas de los estratos de 5 a 20 cm presentaron germinaciones inferiores al 42%, sin presentar diferencias significativas entre sí. En este caso, la tendencia a disminuir de los porcentajes de germinación entre ambos momentos, podría evidenciar una reinducción a la dormición secundaria en estas semillas.

Al analizar la viabilidad de las semillas evaluadas, en primer lugar, se observó que en Olavarría, a pesar de los bajos porcentajes de germinación obtenidos en la extracción de mayo en los estratos de 0-5 y 5-10 cm, la viabilidad de estos superó el 70%, aunque se diferenciaron entre sí (Figura 8).

Con respecto a la evaluación de la viabilidad en el caso de Azul, los mayores valores que superaron el 70% se obtuvieron en el estrato superficial, que se diferenció de la viabilidad del estrato inmediatamente inferior (5-10 cm), cuyo valor fue de un 63% para este parámetro, y de los estratos profundos donde la viabilidad fue menor. Los dos estratos más profundos presentaron una viabilidad de 53%, no diferenciándose entre sí, pero se diferenciaron del estrato 5-10 cm (Figura 8). Comparando la información obtenida en la germinación y viabilidad, en primer lugar, se puede apreciar que prácticamente todas las semillas viables del estrato superior germinaron. En el resto de los estratos no todas las semillas viables germinaron en el período de evaluación.

Evaluando dentro de una misma localidad, se encontraron disminuciones estadísticamente significativas de la viabilidad, a medida que se incrementa la profundidad de muestreo, lo cual es esperable si se asume que las semillas más profundas son cronológicamente anteriores que las más superficiales. Por otra parte, se evidencia una clara diferencia en el comportamiento de los propágulos encontrados en el banco de semillas superficial (muestras de 0-10 cm), que posiblemente estén mayoritariamente conformados por la dispersión de semillas del año. Por su parte, las semillas enterradas a mayor profundidad presentarían mayor antigüedad (varios años de entierro).

En ambas localidades, se puede apreciar que en el estrato superior (0 – 5 cm) la viabilidad fue siempre superior al 74%; y también que el estrato más profundo (15 - 20 cm) tuvo viabilidades de alrededor de un 50%. En los estratos intermedios (5-10 y 10-15 cm), la viabilidad observada en las semillas provenientes de Azul resultó ser entre un 7 y un 12% inferior a las de Olavarría.

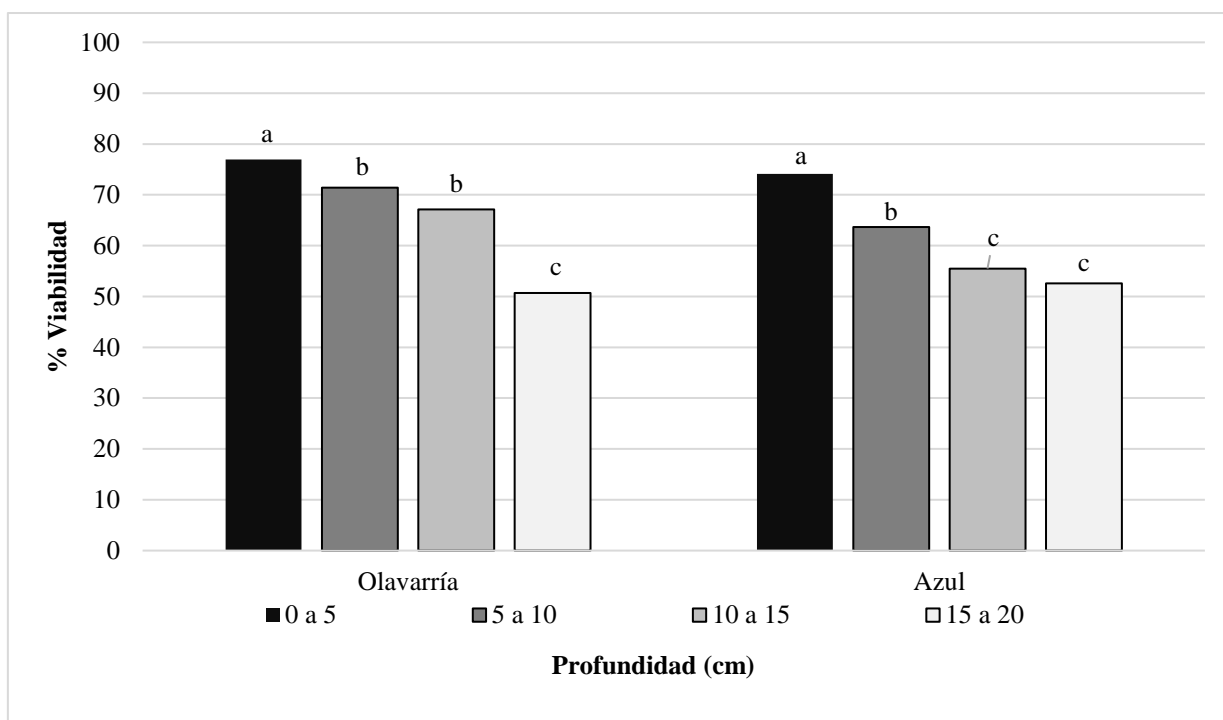


Figura 8. Porcentaje de viabilidad, en laboratorio, de semillas de *E. davidii*, extraídas de 4 estratos de profundidad en lotes agrícolas de Olavarría y Azul (2012 y 2014). Las comparaciones son sólo válidas dentro de cada localidad. Letras iguales indican que no existen diferencias significativas entre sí (test de Tukey,  $p \leq 0,05$ ).

La labranza podría tener diferentes efectos sobre la viabilidad y persistencia del banco de semillas. Cuando las labranzas son poco frecuentes, pero profundas, hay una alta probabilidad de que las semillas se muevan a capas profundas, donde la germinación se verá reducida por reinducción a la dormición secundaria o por ausencia de factores biofísicos adecuados para la germinación (luz, agua, temperatura,  $O_2$ , etc.). Si la longevidad de las semillas en profundidad se viera reducida (ej. en bancos transitorios), la tendencia será hacia una declinación del número de semillas en el banco ya que morirán antes de ser llevadas a la superficie por otro laboreo. Por el contrario, si la supervivencia fuera de varios años (bancos persistentes), los laboreos tendrán un efecto beneficioso, ya que moverán las semillas hacia sitios seguros. Por lo cual, la dinámica de una población de malezas con banco de semillas persistente, estará influenciado por la frecuencia e

intensidad de laboreos (Eager et al., 2013). En este mismo sentido, estudios realizados durante 72 meses indican que la longevidad de las semillas estaría relacionada en forma directa con el aumento de profundidad y en forma inversa con la intensidad de remoción (Leguizamón, 1983).

Con respecto a la longevidad de semillas de malezas en un suelo cultivado, Barralis et al. (1988) consideran dos grupos de especies: aquellas con una alta tasa de declinación anual en el número de semillas en el banco, dentro de las que se encuentran *Alopecurus myosuroides*, *Avena fatua*, *Centaurea cyanus*, *Galium aparine*, *Lapsana communis* y *Matricaria perforata*; y especies con una baja tasa de disminución anual, dentro de las cuales se incluyen algunas *Euphorbiaceas*, como *Euphorbia exigua*. Roberts y Dawkins (1967), mencionan que eliminando el aporte de nuevos propágulos, la reducción en el número de semillas viables del banco, fue de un 22% anual para sitios no disturbados y de un 30 a 36 % para situaciones con dos y cuatro disturbios por año, respectivamente.

En trabajos realizados con el fin de determinar la viabilidad y el rango de temperaturas óptimas de germinación de *E. davidii* provenientes de dos cosechas (1995 y 2009), se determinó que en general, la viabilidad de semillas recién cosechadas supera el 90% (Marchessi et al., 2011b). Las semillas conservadas durante 14 años, en condiciones de laboratorio, arrojaron valores de germinación de un 40%, mientras que para propágulos almacenados durante un año la germinación fue del 73% (Marchessi et al., 2011<sup>a</sup>). Si bien no se conoce con exactitud la longevidad de las semillas de *E. davidii* en el suelo, es posible que la misma sea similar a la de otras *Euphorbiaceas*, con lo cual es necesario pensar el control de esta maleza, como una problemática a mediano o largo plazo.

De todas formas, es interesante destacar que en ambas localidades se encontraron evidencias de comportamientos diferenciales entre el estrato superior y el resto del banco

de semillas. Las semillas del estrato 0-5 cm provienen principalmente, del último aporte de semillas de la planta madre, y por lo tanto su comportamiento y biotipos, se van a corresponder con las condiciones de crecimiento de *E. davidii* del ciclo inmediatamente anterior. El resto del banco de semillas está principalmente conformado por propágulos de diferentes edades, que provienen de plantas desarrolladas en diversas condiciones ambientales y compuesto por distintas proporciones de genotipos, con lo cual sería probable un comportamiento diferente al del estrato superficial. Esta variabilidad en la composición del total del banco de semillas, brinda un efecto "buffer", que le permite a la maleza contar con un pool genético amplio, que favorece un ajuste al medio ambiente (fitness) de la región (Levin, 1990).

Evidentemente la diferencia en la germinación del banco superficial entre las extracciones realizadas en mayo para las dos localidades, indican que el fenómeno de dormición se encuentra posiblemente en relación al efecto materno, y la interacción genotipo x ambiente, aspectos que requieren futuros estudios.

A partir de la evidencia existente sobre *E. davidii* se puede afirmar la formación de bancos de semillas persistentes en los lotes agrícolas evaluados. Se pudo constatar que es una especie con una gran abundancia de semillas en el suelo, a pesar de contar con semillas de tamaño relativamente grande; encontrándose más de 11000 semillas m<sup>-2</sup> en Olavarría y más de 20000 semillas m<sup>-2</sup> en Azul. Estas diferencias de abundancia podrían estar influenciadas, entre otros factores, por un mayor tiempo de presencia de la especie, dado que en el lote de Azul se tienen registros desde fines de la década del '90, y en el lote de Olavarría, los primeros registros son de 2006. Con respecto a la distribución, se pudo apreciar que en el lote en siembra directa continua cerca del 80% de las semillas se encuentran en el estrato superficial (0 a 5 cm), mientras que por efecto de la labranza ese porcentaje se redujo hasta el 50% aproximadamente. La germinación mostró una marcada

variabilidad con respecto a localidad, profundidad y momento de muestreo; manifestándose claramente los efectos de dormición de las semillas. La viabilidad no mostró diferencias en ambos momentos de muestreo, siendo superior al 70% en el estrato superficial, y disminuyendo hasta alrededor de un 50% en el estrato más profundo. El efecto de labranza solamente afectó significativamente la viabilidad de los estratos intermedios de semillas (5-10 y 10-15 cm), provocando reducciones de entre 7 y un 12%.

## **CAPITULO III**

### **ESTUDIOS DEMOGRAFICOS DE *Euphorbia davidii* (\*)**

(\*) Parte de la información incluida en este capítulo ha sido publicada: Núñez Fré, F.R.; Juan, V.F.; Saint André, H.M.; Chantre, G.R. (2018). Demographic and Phenological Studies on David's Spurge (*Euphorbia davidii*) in the Central Area of Buenos Aires Province, Argentina. *Planta Daninha* **36**, e18174369. Epub October 11, 2018.



## **1. Introducción**

La dinámica poblacional es el campo de la ecología que se encarga de estudiar el comportamiento de una agrupación de individuos de la misma especie a través del tiempo y el espacio (Cividanes, 2002).

La supervivencia de una población, es uno de los factores más importantes a considerar en un estudio de demografía de poblaciones vegetales. Para evaluar dicho parámetro, es necesario acudir tanto a estudios de laboratorio como de campo (Win et al., 2009).

En general, se utilizan tres tipos de estrategias para determinar la supervivencia de poblaciones naturales y por tanto, para construir tablas de vida. En el primer tipo de estrategia, la supervivencia es observada directamente; y la información se obtiene partiendo de una gran cohorte nacida al mismo tiempo, que es estudiada a intervalos regulares a lo largo de toda su vida. Otra alternativa consiste en medir la edad al momento de la muerte, y utilizar esos datos para estimar las funciones de la tabla de vida. En este caso, es necesario suponer que la población es estable en el tiempo y que las tasas de nacimiento y muerte de cada grupo de edad permanecen constantes (Deevey, 1947). Por último, es posible determinar la estructura de edades o grupos etarios. En algunos organismos, es posible establecer cuántos individuos de cada edad coexisten en la población, por ejemplo, recurriendo a contar los anillos de crecimiento de los árboles (dendrocronología) (Cook y Kairiukstis, 2013) o simplemente contabilizando los individuos en sus distintos estados fenológicos en el caso de las malezas anuales.

La supervivencia puede ser expresada en forma de curvas, y de acuerdo a la forma general de estas pueden ser clasificadas en tres tipos. Las de tipo I (convexas), describen las situaciones en las que la mortalidad se concentra en el extremo de la esperanza de vida máxima (ej. animales en un zoológico o las hojas de una planta). Las curvas tipo II (rectas)

indican que la probabilidad de muerte permanece constante con la edad, y puede aplicarse correctamente a los bancos de semillas de muchas de las poblaciones de plantas. Por último, las tipo III (cóncavas) indican una extensa mortalidad temprana, seguido de una alta tasa de supervivencia en estadios más tardíos. Esto es típico, por ejemplo, de muchos peces marinos que producen millones de huevos, de los cuales muy pocos sobreviven hasta convertirse en adultos (Pearl, 1928; Deevey, 1947).

Posteriormente, los datos de supervivencia se incorporan como parte de los procesos demográficos siguiendo la estructura de una tabla de vida o modelo multiestado dinámico (González-Andújar y Fernández-Quintanilla, 1991). Dicho modelo diagramático representa de forma sinóptica y sintética las variables y procesos demográficos de forma cuantitativa (numérica) (Fazle Rabbi, 2013). Las tablas de vida multiestado se construyen siguiendo, desde el nacimiento hasta la muerte del último individuo, la supervivencia y fecundidad por edades de una cohorte de individuos que forman parte de una población (Ricklefs, 1990). Una de las primeras evaluaciones de este tipo fue realizada para la planta anual *Phlox drummondii* por Leverich y Levin, (1979). En este caso, una cohorte de individuos (es decir, un grupo de individuos coetáneos) fue seguido desde el nacimiento a la muerte del último superviviente. El ciclo de vida de *Phlox* fue dividido en una serie de clases de edad. En otros casos, es más apropiado dividirlo en fases (por ejemplo, los insectos con huevos, larvas, pupas, etc.) o en clases de tamaño. La ventaja de utilizar clases de edad, es que permite obtener detalles de los patrones de nacimiento y mortalidad dentro de las etapas (por ejemplo, en el estado de plántula), pero por otra parte existe la desventaja de que la edad del individuo no es necesariamente la mejor, ni siquiera una satisfactoria medida de su “status” biológico. En muchas plantas de larga vida, por ejemplo, los individuos de la misma edad pueden estar reproduciéndose de forma activa, o crecer vegetativamente, pero no reproducirse. En tales casos, una clasificación basada

en las etapas de desarrollo o fenológica (como oposición a las clases de edad) es claramente apropiada (Begon et al., 2006).

Algunas limitaciones que presentan este tipo de tablas de vida, es que son difícilmente aplicables en el caso de organismos de vida larga (ej. *Sequoia* spp.), o altamente móviles, y/o en el caso de organismos con reproducción repetida y generaciones superpuestas (en estos últimos, puede ser difícil reconocer cada una de las cohortes, monitorearlas y diferenciarlas correctamente del resto de las cohortes).

La información bioecológica básica provista por estos modelos es de considerable valor agronómico en el diseño de programas sustentables de manejo de malezas (Rabinovich, 1980; Begon et al., 1988). Claramente, las tablas de vida representan una de las principales formas en las que conceptualizar la estructura de la población y analizar su dinámica.

A pesar de que muchos cambios fenológicos o eventos que ocurren en las plantas pueden ser definidos usando escalas numéricas (por ejemplo, basado en días calendario), puede ocurrir interferencia en la información obtenida, debido a factores ambientales y ecofisiológicos. Contrariamente, el tiempo térmico ha demostrado ser una medida adecuada del “tiempo fisiológico” para evaluar el crecimiento de las plantas (Aitken, 1974; Trudgill et al., 2005), considerando a la temperatura como el factor climático más importante que influye en la aparición de eventos fenológicos (Russelle et al., 1984; Gadioli et al., 2000).

El conocimiento de los requerimientos de tiempo térmico de una especie de maleza dada, permite predecir su respuesta a diferentes condiciones ambientales, escenarios agroecológicos, o evaluar el efecto de las prácticas culturales (por ejemplo, fechas de siembra) sobre las diferentes etapas de crecimiento y desarrollo del ciclo de vida.

*E. davidii* es considerada una especie altamente competitiva y de difícil control debido a la baja eficacia que presentan la mayoría de los tratamientos químicos, asociado a la gran dependencia del estado fenológico de la maleza al momento del control (Juan y Saint André, 1997; Juan et al., 2000). Las reducciones sobre parámetros del crecimiento en cultivos de soja, determinadas en condiciones semi controladas de laboratorio, oscilan entre 35 al 45 % para una densidad de maleza de 100 plantas m<sup>-2</sup> comparada con el testigo libre de competencia (Juan y Saint André, 1995).

A nivel mundial, poco se conoce acerca de estrategias de manejo para controlar esta especie (Storrie y Cook, 1996) y en Argentina los estudios más recientes realizados por Juan et al. (2011) han demostrado la creciente dificultad de control de *E. davidii* utilizando glifosato como único herbicida en sojas transgénicas resistentes a glifosato (RR).

El objetivo de este capítulo consistió en estudiar distintos aspectos de la dinámica poblacional de *E. davidii* mediante el análisis y el seguimiento de cohortes a campo en la zona centro de la provincia de Buenos Aires. A tal fin se implementa una escala de tiempo térmico para caracterizar cada etapa fenológica brindando información ecofisiológica básica sobre el ciclo de vida de la especie.

## **2. Materiales y métodos**

### *Sitio de estudio*

Los experimentos se llevaron a cabo durante las campañas de cultivo 2011/12 y 2013/14, en un campo ubicado en Sierras Bayas, Olavarría, provincia de Buenos Aires, Argentina (36°58'4.30" S; 60° 11'45.35" O). El sitio experimental se encontraba bajo siembra

directa durante los últimos 10 años. El suelo se definió como Argiudol típico con 5% de materia orgánica. La infestación de *E. davidii* en el sitio de estudio se remonta al menos al año 2006, con parches repetitivos de alta infestación ( $> 500$  plántulas  $m^{-2}$ ). El cultivo antecesor en los dos años de experimentación fue soja RR cultivada bajo el sistema de siembra directa.

La información meteorológica diaria fue brindada por la Estación Meteorológica de Olavarría, ubicada a 8,5 km del campo experimental ( $36^{\circ} 53'20''$  S;  $60^{\circ} 13'40''$  O).

### *Diseño experimental*

En el sitio experimental, se marcaron 16 cuadrantes de  $1 m^2$  como parcelas de observación. Las parcelas se ubicaron en un área altamente infestada, con el fin de seguir cada una de las cohortes de la especie durante todo el ciclo. El seguimiento fue realizado sin competencia de cultivo en ambas campañas. Los muestreos comenzaron en el mes de septiembre, y los cuadrantes se asignaron a cada cohorte por orden de emergencia.

Cada cohorte fue definida como el conjunto de plántulas emergidas simultáneamente en un período de dos semanas consecutivas. El número de individuos de cada cohorte se registró semanalmente en cuatro réplicas, identificando las siguientes etapas fenológicas de crecimiento: cotiledón-emergencia (CE), 2 a 4 hojas verdaderas (2-4 H), 6 a 8 hojas verdaderas (6-8 H), ramificación (R), y reproductivo (floración) (F) (ver Capítulo I).

La mortalidad se calculó como la diferencia en el número de individuos entre dos muestreos sucesivos. Las emergencias de individuos correspondientes a otras cohortes y otras especies maleza fueron eliminadas manualmente durante toda la temporada de crecimiento.

El seguimiento de las cohortes finalizó cuando la mayoría de los individuos llegaron a la etapa reproductiva, sin cambios fenológicos adicionales observados en los recuentos. Todas las parcelas fueron cosechadas antes de la dehiscencia natural de los frutos (principios de marzo) y se determinó el número de individuos en fructificación y la producción de semillas por parcela.

El tiempo térmico se calcula como la suma de la temperatura media diaria, sobre una temperatura basal determinada donde la tasa de crecimiento es cercana a cero (Monteith y Moss, 1977). El requerimiento de tiempo térmico para alcanzar los estados de 2-4 H, 6-8 H, R y F se determinó como la suma de tiempo térmico requerida para que al menos el 50% de las plantas alcancen cada etapa fenológica. La información proporcionada por los dos años de estudio se agrupó para el cálculo del tiempo térmico, ya que no se observaron diferencias estadísticas entre ellos.

El tiempo térmico (TT) se calculó según la ecuación 1:

$$TT = \sum [T_x - T_b] \quad \text{eq. 1}$$

Donde  $T_x$  es la temperatura media diaria,  $T_b$  es la temperatura base (estimada en 8°C según Marchessi et al., 2011b). Existen otras metodologías para el cálculo de unidades de tiempo térmico, como GDD “growing degree days” (McMaster y Wilhelm, 1997), pero se optó por el modelo descrito en eq. 1 por su mayor simplicidad.

La acumulación de tiempo térmico para las tres cohortes y dos años se analizó mediante ANOVA. Se realizaron comparaciones de medias mediante el test de Tukey ( $p < 0,05$ ) utilizando el software InfoStat v. 2012 (Universidad Nacional de Córdoba, Argentina).

Los resultados obtenidos de la producción de semillas y la densidad por cohorte se analizaron mediante ANOVA. Se realizó la comparación de medias mediante el test de Tukey ( $p < 0,05$ ) utilizando el software InfoStat v. 2012 (Universidad Nacional de Córdoba, Argentina). La producción total de semillas de cada cohorte y año, fue analizada mediante ANOVA en un diseño factorial.

Se establecieron regresiones no lineales (semi log) entre la producción de semillas (semillas  $m^{-2}$ ) y la densidad de *Euphorbia davidii* (plantas  $m^{-2}$ ), y también entre la producción de semillas individuales (número de semillas por planta) y la densidad, utilizando el software Graph Pad Prism v 6.01.

$$Y = S \times \log(X) + B \quad \text{eq. 2}$$

Donde Y es la producción de semillas (semillas  $m^{-2}$ ) o la producción de semilla individual (semillas por planta), respectivamente, X es la densidad de población (plantas  $m^{-2}$ ), S es la pendiente, y B es la intercepción del modelo en el eje Y.

### **3. Resultados y discusión**

Un resumen de la información climática mensual registrada en los períodos de estudio se muestra en la Tabla 5.

Durante los dos períodos evaluados, la emergencia de *E. davidii* en condiciones de campo generó tres cohortes. Como no se observaron plántulas adicionales después del establecimiento de la tercera cohorte, el cuarto conjunto de parcelas que se habían establecido inicialmente permaneció vacío hasta el final de la experimentación, es decir

de las 16 parcelas originalmente establecidas, se usaron 12 (tres cohortes por cuatro repeticiones cada una).

Tabla 5. Información climática obtenida en la Estación Meteorológica Olavarría (36°53'20" S; 60°13'40" O).

	2011/12							2013/14						
	Temperatura (°C)			HR	Precip.	Temperatura (°C)			HR	Precip.				
	Max.	Min.	Media			Max. Absol.	Min. Absol.	%			(mm)	Max. Absol.	Min. Absol.	%
Septiembre	18,9	4,2	12,5	24,9	-3,4	61	49,7	15,8	4,3	10,7	25,5	-3,5	71	71,8
Octubre	19,2	6,1	13,2	25,5	0,5	74	29,2	20,7	8,2	15,6	27,1	1,2	72	79,1
Noviembre	25,2	11,6	19,9	31,3	5,2	68	161	24,4	10,8	18,7	31,5	5,9	68	92,1
Diciembre	28,9	11,7	22,6	36,2	2,5	54	12,8	30,9	14,4	23,9	37,6	2,0	49	43,8
Enero	30,6	14,6	24,5	38,4	7,5	53	140,7	30,9	14,1	23,2	39,7	5,1	67	89,1
Febrero	26,9	14,2	21,5	33,8	6,9	66	141	25,2	13,6	19,4	31,5	5,4	69	87,2

Durante 2011/12, el primer evento de emergencia se produjo en octubre, llegando a un número máximo de 180 plantas  $m^{-2}$  en el estado de cotiledón (CE) (Figura 9A). El segundo evento se produjo a principios de noviembre con un número inicial de 390 plántulas  $m^{-2}$  (Figura 9B), y la última cohorte se observó a principios de enero, con cerca de 90 plantas  $m^{-2}$  (Figura 9C). En esta temporada, de un total de 660 individuos, 27, 60 y 13% de las plántulas pertenecieron a la primera, segunda y tercer de cohorte, respectivamente (Figura 9 A, B, C).

Durante 2013/2014, la primera cohorte se observó a principios de octubre con una población inicial de 1400 plántulas  $m^{-2}$  (Figura 10 A). La segunda se detectó en la primera semana de noviembre, con una densidad de 630 individuos  $m^{-2}$  al estado CE (Figura 10 B), mientras que la última cohorte se registró a finales de noviembre con un total de 350 plántulas  $m^{-2}$  (Figura 10 C). De un total de 2400 individuos estudiados durante el periodo,



60, 25 y 15% correspondieron a la primera, segunda y tercera cohorte, respectivamente (Figura 10 A, B, C).

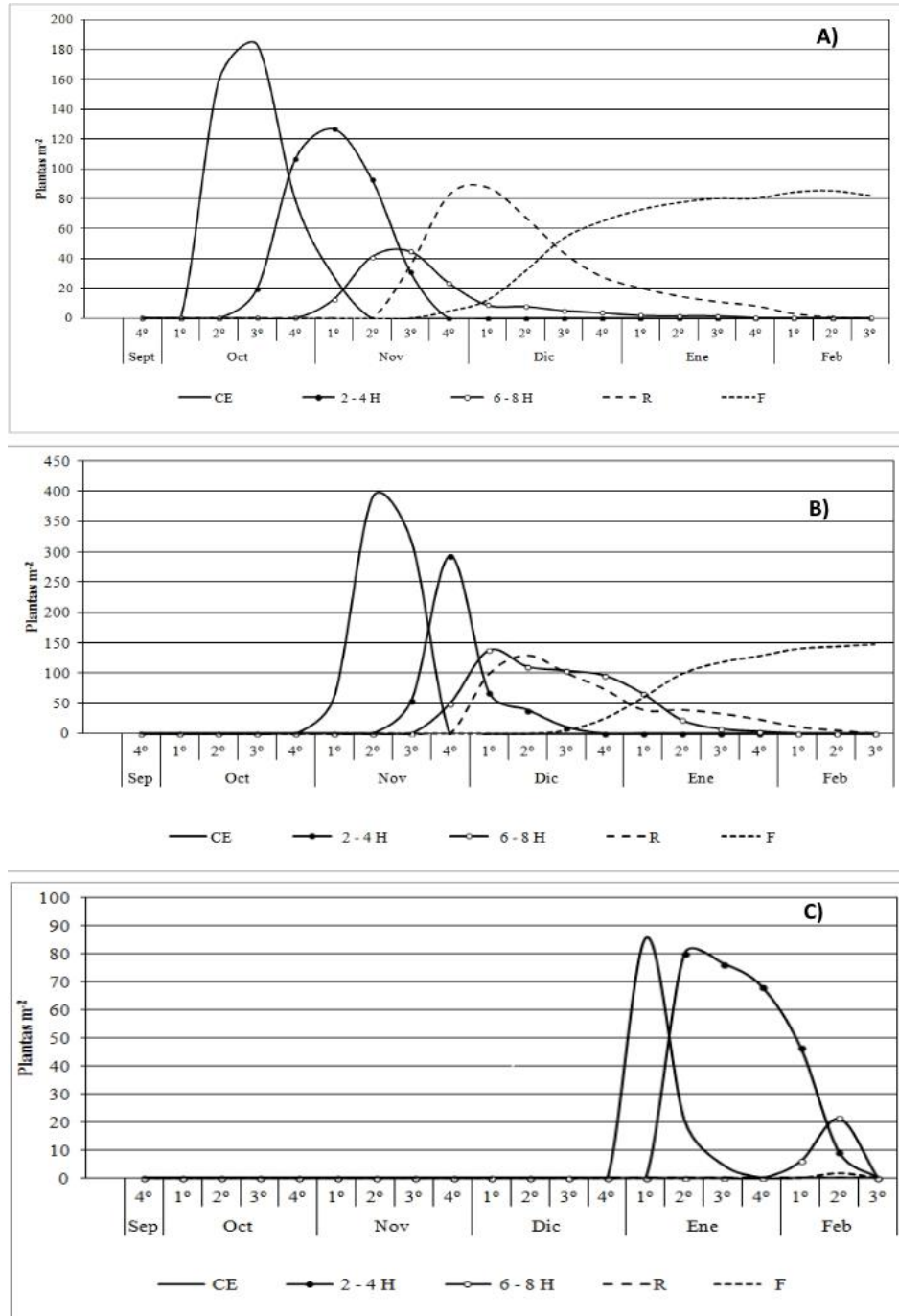


Figura 9. Dinámica poblacional de *E. davidii* durante 2011/12. 1<sup>o</sup>, 2<sup>o</sup> y 3<sup>o</sup> cohorte (A, B, C respectivamente). Se describen las etapas fenológicas de crecimiento: cotiledón-emergencia (CE), 2 a 4 hojas verdaderas (2-4 H), 6 a 8 hojas verdaderas (6-8 H), ramificación (R), y reproductivo (floración y fructificación) (F).

El número de individuos que emergió en cada cohorte varió entre 2011/12 y 2013/14, lo cual podría estar asociado con variaciones en el número y niveles de dormición de semillas en el banco (Núñez Fré et al., 2014), sin embargo hay que señalar que las dos primeras cohortes fueron muy estables en términos de tiempo cronológico de emergencia y en la proporción de individuos que emergieron en relación con el total anual. En ambos períodos de estudio, la emergencia de la primera y segunda cohorte se produjo dentro de octubre y noviembre, y representaron el 80% de la emergencia total anual de la especie evaluada (Figuras 9 y 10).

Como se observa en las figuras 9 y 10, independientemente del número inicial de plántulas establecidas y del aporte de cada cohorte, en total sólo alrededor de 250 plantas alcanzaron etapas reproductivas (F).

La capacidad de carga ( $k$ ) se define como el tamaño de la población que los recursos del entorno pueden sostener indefinidamente (Begon et al., 2006). De lo anterior surge que el valor de  $k$  bajo las condiciones agroecológicas de estos ensayos, se encontraría entre 200 y 300 plantas  $m^{-2}$ . Sin embargo, más estudios deben llevarse a cabo con el fin de validar esta información.

En la Tabla 6 se presenta la relación entre la acumulación de tiempo térmico y los estados fenológicos de *E. davidii* utilizando los datos agrupados de los dos años ya que no presentaron diferencias significativas entre sí. Los requerimientos de tiempo térmico calculados, fueron en promedio de 192, 370, 515 y 1155 °Cd para las etapas 2-4 H, 6-8 H, ramificación (R) y reproductiva (F), respectivamente. La segunda cohorte mostró una tendencia a tener valores más altos de tiempo térmico calculados para todas las etapas fenológicas, sin embargo, sólo se detectaron diferencias significativas con la primera cohorte para el estado de 6-8 H. Estas observaciones permiten inferir cierta influencia del

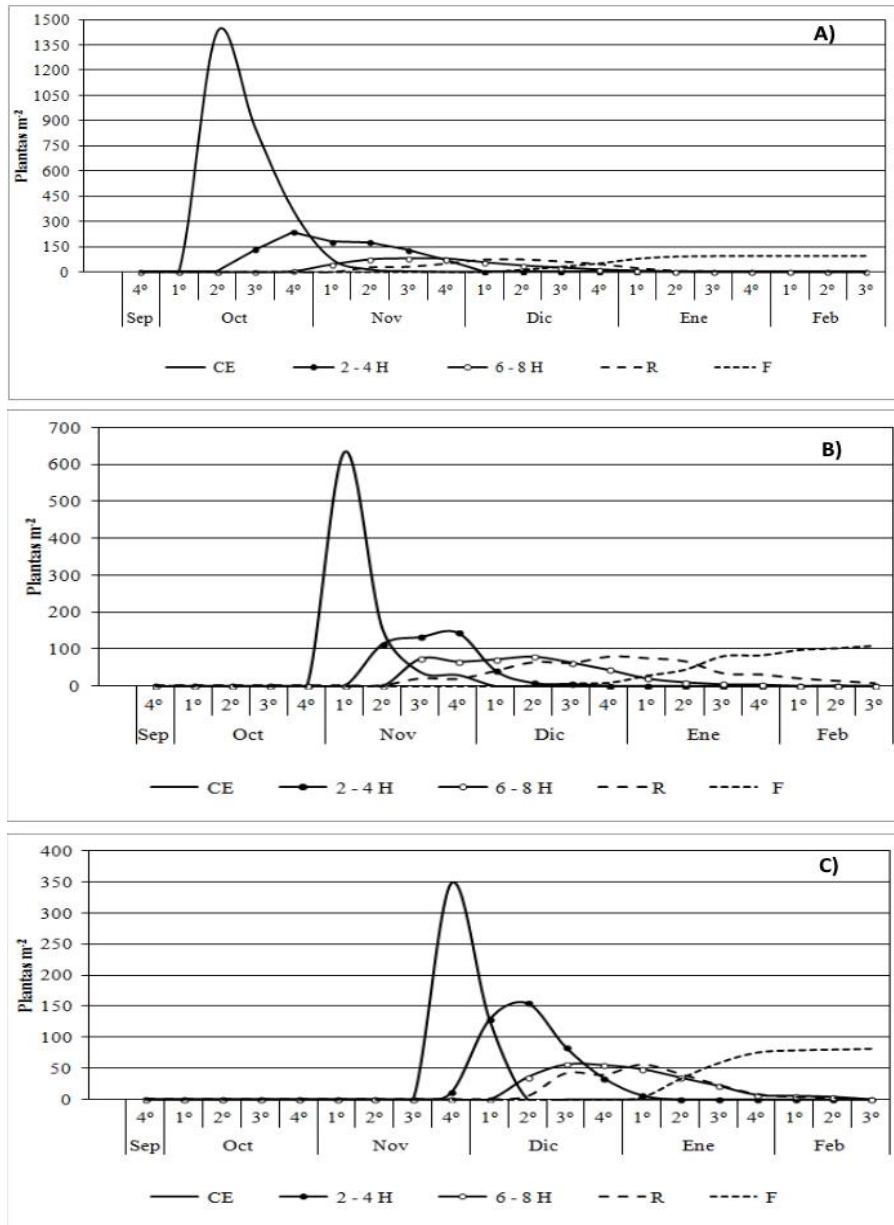


Figura 10. Dinámica poblacional de *E. davidii* durante 2013/14. 1°, 2° y 3° cohorte (A, B, C respectivamente). Se describen las etapas fenológicas de crecimiento: cotiledón-emergencia (CE), 2 a 4 hojas verdaderas (2-4 H), 6 a 8 hojas verdaderas (6-8 H), ramificación (R), y reproductivo (floración y fructificación) (F).

fotoperiodo en la acumulación de tiempo térmico para las diferentes cohortes. Sin embargo, se requieren más investigaciones para aclarar este tema. Además, se destaca que como las observaciones en el campo se registraron semanalmente y las emergencias

individuales no ocurren exactamente el día de la observación, existe una acumulación diferencial de tiempo térmico en plantas individuales dentro de una misma parcela de observación.

Por otro lado, entre los factores ambientales que influyen en la variabilidad de los datos (Tabla 6), se podrían mencionar el estrés térmico e hídrico temporal característicos de la época estival, en la región centro de la provincia de Buenos Aires, los cuales podrían afectar las etapas de crecimiento de la especie, posiblemente evitando alcanzar un estado fenológico determinado, aunque se hubiera alcanzado la suma térmica requerida. Por último, debe tenerse en cuenta que *E. davidii* es una especie que forma un banco de semillas persistente (Núñez Fré et al., 2014) (ver Capítulo 2) conteniendo semillas de diferentes años, adaptadas a diferentes condiciones ambientales, factores que podrían contribuir a una variabilidad intrínseca en los requerimientos de tiempo térmico dentro de las poblaciones.

Tabla 6. Tiempo térmico ( $^{\circ}\text{Cd}$ ) calculado para cada estado fenológico, y cada cohorte, agrupando ambos años (2011/12 y 2013/14). Desvíos estándar entre paréntesis. Letras iguales indican que no hay diferencias significativas entre cohortes, test de Tukey ( $p \leq 0.05$ ).

Estado fenológico	1° cohorte	2° cohorte	3° cohorte
2-4 hojas	171,5 (42,07) a	216,3 (45,39) a	190,5 (36,89) a
6-8 hojas	335,5 (39,90)a	405,2 (62,89) b	372,0 (58,38) ab
R (ramificación)	494,0 (35,78) a	549,4 (53,70) a	502,1 (25,81) a
F (floración y fructificación)	1177,3(54,26) a	1182,0(65,94) a	1107,6(38,40) a

Durante la temporada 2011/12, la primera cohorte mostró la mayor mortalidad entre la cuarta semana de octubre y la tercera semana de noviembre ( $180^{\circ}\text{Cd}$ ), lo que llevó a la reducción del 45% de los individuos en comparación con la población inicial (Tabla 7). Durante este período, las plantas se encontraban principalmente en los estados de

cotiledón y 2-4 hojas (Figura 9 A). En la segunda cohorte, los eventos de mortalidad fueron más homogéneos entre la cuarta semana de noviembre y la primera semana de enero (395°Cd), cuando la mayoría de los individuos transitaban las etapas de 2-4 hojas a ramificación (Figura 9 B), con una reducción del 58% en el número de individuos. La mayoría de los casos de mortalidad en esta cohorte fueron probablemente debidos a individuos que emergieron a muy altas densidades, y que exhibieron tasas de crecimiento más bajas por la competencia intraespecífica. En la última cohorte, ningún individuo llegó a la etapa reproductiva.

Durante la temporada 2013/14 (Tabla 8), la mortalidad de la primera cohorte fue similar a la registrada para la misma cohorte en 2011/12, con la tasa más alta que se produjo entre las etapas de cotiledón y 2-4 hojas. En 2013/14, la mortalidad desde el nacimiento hasta la primera semana de noviembre (140°Cd) causó una reducción del 79% de la población. La segunda cohorte mostró dos eventos de mortalidad significativos, el primero de ellos se produjo en la segunda semana de noviembre (190°Cd), cuando la mayoría de los individuos estaban entre las etapas de cotiledón y 2-4 hojas, generando una reducción del 58% de la población; y el segundo evento de mortalidad se produjo en la primera semana de diciembre (295°Cd), cuando la mayoría de los individuos tenían entre 2-4 y 6-8 hojas, con una reducción de la población del 76% en comparación con la emergencia inicial.

Como ya fue mencionado, los recuentos iniciales de la primera y la segunda cohorte en 2013/14 fueron mucho más altos que los observados en 2011/12, lo que indica posiblemente la ocurrencia de condiciones ambientales más favorables para la salida de la dormición de las semillas y/o el establecimiento de las plántulas.

Tabla 7. Mortalidad de *E. davidii*, expresado semanalmente para cada cohorte en 2011/2012.

Semanas	1° Cohorte			2° Cohorte			3° Cohorte		
	Plantas m <sup>-2</sup>	Mortalidad (%)	Mortalidad Acumulada (%)	Plantas m <sup>-2</sup>	Mortalidad (%)	Mortalidad Acumulada (%)	Plantas m <sup>-2</sup>	Mortalidad (%)	Mortalidad Acumulada (%)
Sept 4°	0	0,0	0,0	0	0,0	0,0	0	0,0	0,0
Oct 1°	0	0,0	0,0	0	0,0	0,0	0	0,0	0,0
Oct 2°	159	0,0	0,0	0	0,0	0,0	0	0,0	0,0
Oct 3°	203	0,0	0,0	0	0,0	0,0	0	0,0	0,0
Oct 4°	186	8,4	8,4	0	0,0	0,0	0	0,0	0,0
Nov 1°	168	9,1	17,5	60	0,0	0,0	0	0,0	0,0
Nov 2°	134	16,6	34,1	391	0,0	0,0	0	0,0	0,0
Nov 3°	111	11,3	45,4	373	4,5	4,5	0	0,0	0,0
Nov 4°	111	0,1	45,6	343	7,8	12,3	0	0,0	0,0
Dic 1°	109	1,0	46,6	304	9,9	22,1	0	0,0	0,0
Dic 2°	107	0,7	47,3	279	6,5	28,6	0	0,0	0,0
Dic 3°	102	2,3	49,6	221	15,0	43,6	0	0,0	0,0
Dic 4°	96	3,1	52,7	194	6,8	50,4	0	0,0	0,0
Ene 1°	95	0,7	53,4	164	7,6	58,0	86	0,0	0,0
Ene 2°	94	0,5	53,9	160	1,2	59,1	119	0,0	0,0
Ene 3°	93	0,5	54,4	158	0,4	59,6	81	31,6	31,6
Ene 4°	89	2,0	56,4	155	0,9	60,5	68	10,8	42,4
Feb 1°	87	0,6	57,0	151	0,9	61,4	53	13,1	55,5
Feb 2°	86	0,7	57,8	149	0,5	61,9	32	17,3	72,8
Feb 3°	82	1,8	59,6	148	0,4	62,3	0	27,2	100,0

A diferencia de lo observado en 2011/12 en cuya temporada se registró la última cohorte a mediados de enero, en 2013/14 se detectó la última cohorte a finales de noviembre, con una densidad inicial de 350 plántulas m<sup>-2</sup> (Figura 10 C). En este caso, los eventos de

mortalidad fueron similares a la cohorte anterior, con dos grandes eventos que ocurrieron en diciembre. Se observó que el primer evento de mortalidad se produjo entre la primera y segunda semana de diciembre (170°Cd) cuando la población se encontraba mayoritariamente entre las etapas de cotiledón y 2-4 hojas, causando una reducción del 45% en el número de individuos; el segundo, a su vez, se produjo en la cuarta semana de diciembre (370°Cd), cuando la mayoría de los individuos estaban entre las etapas 2-4 y 6-8 hojas, con una reducción del 65% en la población en comparación con la población inicial (Tabla 8). Es notable señalar que la tercera cohorte logró producir individuos que alcanzaron el estado reproductivo y generaron descendencia viable, mientras que en la temporada 2011/12 ninguno de los individuos logró producir semillas (Tabla 9).

Al analizar la ocurrencia de las cohortes de *E. davidii* en 2011/12 y 2013/14, se encontraron algunas similitudes. En general, las emergencias de individuos de la primera y segunda cohorte representaron más del 80% de la emergencia total anual de la especie. Se observó una mortalidad inicial significativa (entre etapas de cotiledón y 2-4 hojas) en las primeras cohortes, con una reducción de plántulas entre 50 y 80% de la emergencia inicial registrada (Tabla 7 y 8).

La segunda cohorte también mostró similitudes entre ambos períodos, con dos eventos significativos de mortalidad; entre las etapas de cotiledón y 2-4 hojas, y entre etapas de 2-4 y 6-8 hojas. Al mismo tiempo, dada la no ocurrencia de competencia interespecífica debería considerarse que la competencia con el cultivo y otras especies de malezas seguramente podrían alterar los resultados de estas evaluaciones, aumentando y adelantando los casos de mortalidad en cada evento (Tabla 7 y 8). La tercera cohorte tuvo un comportamiento diferente en los años evaluados. En 2011/12, la aparición tardía dio lugar a individuos que no fueron capaces de producir propágulos (Tabla 9).

Tabla 8. Mortalidad de *E. davidii*, expresado semanalmente para cada cohorte en 2013/2014.

Semanas	1° Cohorte			2° Cohorte			3° Cohorte		
	Plantas m <sup>-2</sup>	Mortalidad (%)	Mortalidad Acumulada (%)	Plantas m <sup>-2</sup>	Mortalidad (%)	Mortalidad Acumulada (%)	Plantas m <sup>-2</sup>	Mortalidad (%)	Mortalidad Acumulada (%)
Sept 4°	0	0,0	0,0	0	0,0	0,0	0	0,0	0,0
Oct 1°	0	0,0	0,0	0	0,0	0,0	0	0,0	0,0
Oct 2°	1422	0,0	0,0	0	0,0	0,0	0	0,0	0,0
Oct 3°	988	30,5	30,5	0	0,0	0,0	0	0,0	0,0
Oct 4°	604	27,0	57,5	0	0,0	0,0	0	0,0	0,0
Nov 1°	298	21,5	79,1	634	0,0	0,0	0	0,0	0,0
Nov 2°	288	0,7	79,7	267	57,8	57,8	0	0,0	0,0
Nov 3°	242	3,2	83,0	263	0,7	58,6	0	0,0	0,0
Nov 4°	198	3,1	86,0	256	1,0	59,6	359	0,0	0,0
Dic 1°	131	4,8	90,8	151	16,6	76,1	256	28,5	28,5
Dic 2°	127	0,3	91,1	150	0,2	76,4	195	17,0	45,5
Dic 3°	120	0,4	91,5	135	2,3	78,7	182	3,7	49,2
Dic 4°	114	0,4	92,0	130	0,7	79,5	128	15,0	64,3
Ene 1°	111	0,2	92,2	122	1,3	80,8	114	3,8	68,1
Ene 2°	102	0,6	92,8	119	0,4	81,2	109	1,5	69,6
Ene 3°	102	0,1	92,9	118	0,2	81,4	103	1,6	71,2
Ene 4°	101	0,0	92,9	116	0,3	81,7	91	3,5	74,7
Feb 1°	100	0,1	93,0	115	0,1	81,8	88	0,8	75,5
Feb 2°	98	0,1	93,1	114	0,1	81,9	86	0,4	75,9
Feb 3°	95	0,2	93,3	114	0,1	82	81	1,4	77,3

En general, el comportamiento de las cohortes de *E. davidii* se asemejan a una especie estratega r, con una alta tasa de natalidad y mortalidad inicial, entre las etapas cotiledón y 2-4 hojas (Tablas 7 y 8), seguido por menores tasas de mortalidad en las etapas de



crecimiento más avanzadas, y una importante fracción de los recursos asignados para la reproducción (Gadgil y Solbrig, 1972).

Considerando ambos periodos evaluados a campo, se concluye que la primera cohorte contribuyó con más de 50% de los individuos totales, pero también mostró la menor probabilidad de supervivencia en la fase de cotiledón, menos de 25% de los individuos que llegan a la etapa de 2-4 hojas y sólo el 10% alcanza la fructificación (Figura 11). El principal factor adverso que limita la supervivencia de las plántulas emergidas de *E. davidii* son las bajas temperaturas registradas durante principios de la primavera cuyas mínimas pueden alcanzar 0°C (Tabla 5). La segunda cohorte contribuyó con alrededor del 30% de las plantas y su nivel de supervivencia fue relativamente alta, con una mayor contribución de individuos que llegan a la etapa de fructificación (alrededor del 25%) y que permiten la perpetuación de la especie. En este caso, las emergencias de noviembre permiten un rápido crecimiento de la especie ya que la probabilidad de heladas (< 0°C) es casi nula y la temperatura media diaria en este mes suele ser superior a 8° C. La tercera cohorte mostró la mayor variabilidad (Figura 9 y 10). A pesar de que en general contribuyó, en promedio, con un 14% del total de individuos emergidos, sólo el 14% de los mismos lograron completar el ciclo de vida (Figura 11). En uno de los períodos de estudio, ningún individuo de la tercera cohorte logró sobrevivir debido a las condiciones climáticas, tales como estrés térmico e hídrico, así como una mayor incidencia de ataques de hormigas, larvas de lepidópteros, trips, y tucuras que suelen afectar gravemente a la producción de semillas.

Tabla 9. Producción de semillas individual y poblacional, y densidad de población por cohorte durante 2011/12 y 2013/14. Letras iguales indican que no hay diferencias significativas, test de Tukey ( $p \leq 0.05$ ).

Producción de semillas (fecundidad)				
Año	Cohorte	Plantas m <sup>2</sup>	Semillas m <sup>2</sup>	Semillas planta <sup>-1</sup>
2011/12	1° cohorte	94,53 b	6610,50 cd	55,20 b
2011/12	2° cohorte	113,68 b	7559,25 d	48,23 b
2011/12	3° cohorte	0 a	0 a	0 a
2013/14	1° cohorte	106,25 b	4792,43 bc	63,93 bc
2013/14	2° cohorte	183,25 c	5279,28 bcd	43,39 b
2013/14	3° cohorte	40,63 a	3925,24 b	96,03 c

En ambientes con baja predictibilidad en la disponibilidad de recursos escasos, el tiempo de germinación y emergencia es un rasgo crucial que afecta a la supervivencia, el crecimiento, la fenología de la floración y el éxito reproductivo (Hartzler et al., 2004). En resumen, las tasas de mortalidad más altas registradas en las etapas de cotiledones a 6-8 hojas indican que la probabilidad de transición en estas primeras etapas fenológicas a través de todas las cohortes es generalmente inferior o cercana al 30%, mientras que la mortalidad de 6-8 hojas a etapas de floración fue inferior a 25% y en algunos casos resultó insignificante (Figura 11).

La producción de semillas (Tabla 9) varió entre las cohortes durante ambos períodos. Sin embargo, durante la temporada 2011/12, no se observaron diferencias estadísticamente significativas entre la primera y segunda cohorte, pero sí con la tercera cohorte que no logró producir descendencia. En el período 2013/14, no se observaron diferencias significativas en la producción de semillas entre las tres cohortes. La tercera cohorte mostró una menor producción de semillas, pero alcanzó aproximadamente 4000 semillas m<sup>-2</sup> (Tabla 9).

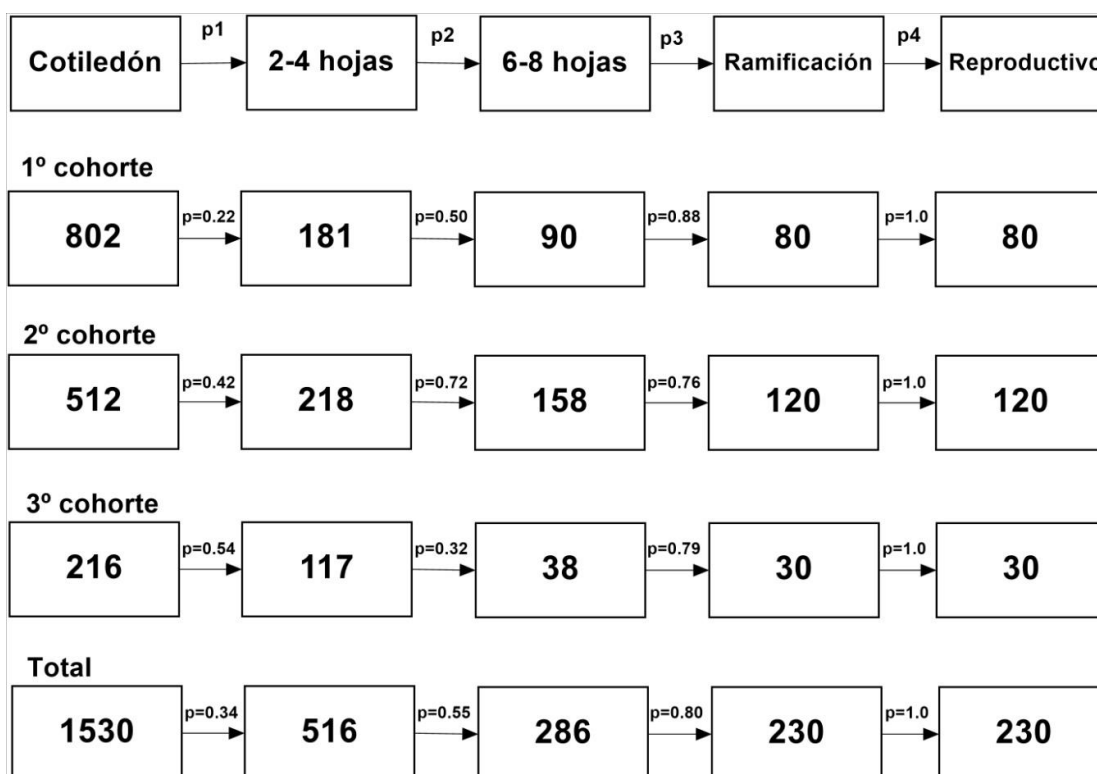


Figura 11. Gráfico de resumen de los años 2011/12 y 2013/14. Los números indican el número de individuos  $m^{-2}$  y las flechas indican la probabilidad de transición entre diferentes estados fenológicos. En promedio aproximadamente 1500 individuos  $m^{-2}$  emergieron anualmente, incluyendo las tres cohortes.

Realizando un agrupamiento de información para ambos períodos bajo estudio, se observó que el promedio de producción de semillas de la primera, segunda y tercera cohorte fue de 5700, 6400 y 1900 semillas  $m^{-2}$ , respectivamente. La segunda cohorte en 2011/12 produjo un mayor número de semillas en comparación con la misma cohorte en 2013/14, aunque no se detectaron diferencias estadísticamente significativas; mientras que la tercera cohorte produjo más semillas en el último año evaluado. Sin embargo, el número total de propágulos, sumando las tres cohortes, fue similar en ambos períodos (2011/12 y 2013/14), alrededor de 14000 semillas  $m^{-2}$ .

La producción de semillas de la población (semillas  $m^{-2}$ ) se ve influenciada por la densidad poblacional (Figura 12A). La producción de semillas se incrementó con la densidad, sin embargo, no se observa un aumento significativo en la producción de

semillas cuando la población alcanza las 150 plantas  $m^{-2}$ . Más allá de esta densidad de población, posiblemente, la adición de un nuevo individuo se vería compensado por una reducción en la fecundidad de cada planta individual.

Por otra parte, la fecundidad individual (semillas por planta) está aún más fuertemente influenciada por la densidad de población (Figura 12B). Las altas densidades de población pueden causar una fuerte competencia intraespecífica reduciendo significativamente el éxito reproductivo de la planta (Cordes et al., 2004).

La producción de semillas de la población (semillas  $m^{-2}$ ), de acuerdo con los estudios realizados en 2011/12 y 2013/14, parece estar influenciada principalmente por el momento de emergencia de las cohortes y las condiciones ambientales del año (Tabla 9), mientras que la fecundidad por planta fue más afectada por la densidad de población (Figura 12).

Teniendo en cuenta que la máxima emergencia anual observada en las condiciones de desarrollo de este estudio fue inferior a 2500 individuos  $m^{-2}$ , y que el promedio de producción de semillas fue de 14000 semillas  $m^{-2}$  se infiere que, aunque la capacidad de porte del sistema sea fácilmente alcanzada en un espacio delimitado (lote), *E. davidii* tendría posibilidades de colonizar nuevos nichos y consecuentemente explotar recursos disponibles del sistema.

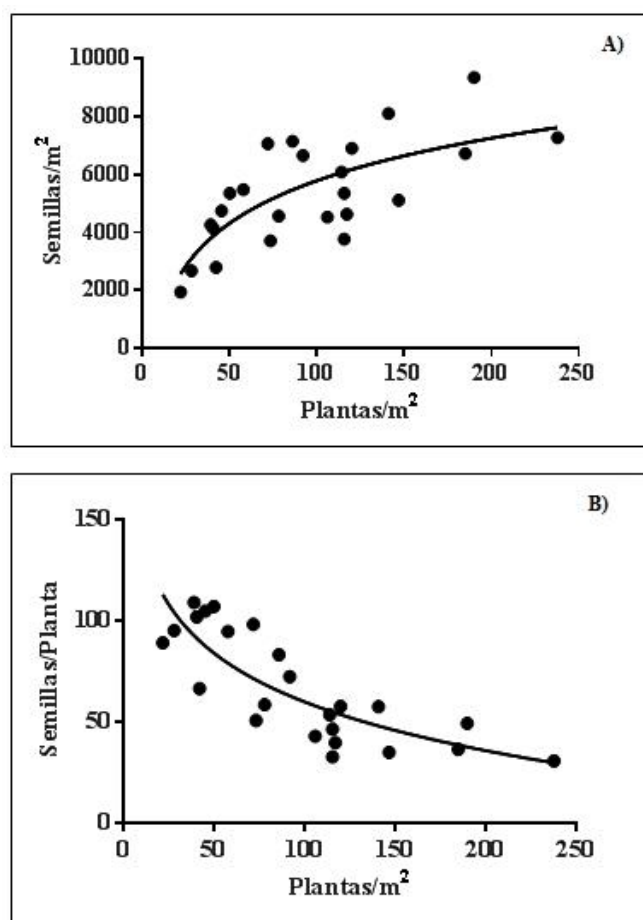


Figura 12. (A) Producción de semillas de la población (2011/12 y 2013/14) en función de la densidad de *E. davidii* ( $Y = 4870 \times \log(X) - 3952$ )  $R^2 = 0,54$ . (B) Fecundidad (2011/12 y 2013/14) en función de la densidad de *E. davidii* ( $Y = -80,37 \times \log(X) + 220,6$ )  $R^2 = 0,66$ .

Como ya fue señalado en ambos períodos, independientemente de la cohorte o el número inicial de plántulas, el total de individuos que realmente alcanzó a fructificar y producir semillas viables fue siempre menor de 300 plantas  $m^{-2}$  (Figura 11). Por lo tanto, una pequeña cantidad de individuos no controlados (escapes de tratamiento químico) de las sucesivas cohortes podrían ser suficientes para producir un gran número de semillas. Esto puede generar una tendencia hacia la acumulación de un mayor número de propágulos de *E. davidii* en el banco de semillas del suelo y por consiguiente mayores densidades de emergencias en los años siguientes. Esto podría explicar en parte el elevado número de emergencias ( $>500$  plantas  $m^{-2}$ ) observado en condiciones de campo.

Hay que destacar el papel de la tercera cohorte de *E. davidii* en los agroecosistemas del centro de la provincia de Buenos Aires, ya que mostró una gran flexibilidad en cuanto al momento de emergencia, siendo capaz de adaptarse a la variabilidad ambiental en comparación con la primera y segunda cohorte. Además, en los lotes de producción es posible que por su densidad y momento de emergencia esta cohorte no sea controlada, teniendo en cuenta que puede estar por debajo del umbral económico, lo que contribuiría a la reposición del banco de semillas y por lo tanto al aumento de los niveles de infestación.

De acuerdo a estudios realizados por Juan et al. (2003), un nivel de infestación de 100 plantas  $m^{-2}$  de *E. davidii* daría lugar a reducciones en el rendimiento de soja de alrededor del 30% manifestándose a través de una disminución en el número de vainas planta<sup>-1</sup>, y en menor medida el peso de 1000 semillas. Juan y Saint-André (1995) mostraron que una densidad de 60 plantas  $m^{-2}$  puede tener un efecto significativo de competencia con cultivos de soja afectando la cantidad de hojas trifoliadas, el área foliar y el peso seco de la planta.

Sobre la base de la información obtenida a partir de estudios anteriores, hay varias cuestiones a tener en cuenta. En primer lugar, los niveles de infestación de *E. davidii* se han incrementado de manera significativa, ya en que en relevamientos realizados durante los meses de verano en octubre a partir del año 2000, se consideraban  $<100$  plantas  $m^{-2}$  como densidades frecuentes de esta maleza (Juan et al., 2003), mientras que en 2011/12, la emergencia máxima fue de alrededor de 700 plantas  $m^{-2}$ , y en 2013/14 las densidades fueron mayores a 2000 plantas  $m^{-2}$ .

Según Juan et al. (2002), para las densidades observadas precedentemente ( $< 100$  plantas  $m^{-2}$ ), los niveles de control de 80% eran aceptables, puesto que las restantes plantas sin control no causaban reducciones en los niveles de producción en relación con las parcelas

de control libres de malezas. Sin embargo, actualmente debido a un aumento significativo en las densidades iniciales, las técnicas de control (incluso con eficiencias > 95%) pueden resultar insuficientes dado que los remanentes de plantas no controladas exceden los umbrales de daño económico, requiriéndose más de una aplicación de herbicidas, o la integración de otras alternativas de manejo complementarias.

Por otra parte, un mayor número de individuos, junto con la necesidad de mayor número de aplicaciones de herbicidas podría aumentar significativamente el riesgo de desarrollo de resistencia, especialmente cuando se considera que la mayoría de los controles químicos de post-emergencia en los cultivos RR del centro de la provincia de Buenos Aires utilizan glifosato como herbicida principal.

El control químico es la estrategia más utilizada en todo el mundo para controlar las malezas (Christoffoleti, 2004), y en la actualidad el glifosato es el herbicida más empleado en los cultivos de soja y maíz RR (Duke, 2018). En el caso del control de *E. davidii* con glifosato, se sabe que los estados más sensibles se encuentran entre 2-4 hojas y el inicio de ramificación; además el comienzo de la floración es un punto crítico en el que las dosis de control se incrementan notablemente y los controles a campo se vuelven más erráticos (Juan et al., 2011).

Considerando la escala de tiempo térmico establecida, el mejor momento para el control a campo, se hallaría entre 200 y 500 °Cd, lo que comprende los estados fenológicos de 2-4 hojas a ramificación.

Basados en la información de este trabajo, la acumulación de tiempo térmico de 500 °Cd, considerado como el límite para un control aceptable, ocurrió en la octava semana desde la emergencia para la primera cohorte, en la sexta semana para la segunda cohorte, y entre la cuarta y la sexta semana para la tercera cohorte, de acuerdo al momento de emergencia. Debe tenerse en cuenta que medido en días calendario, las cohortes tardías tendrán una

ventana más estrecha para la aplicación eficaz con herbicidas ya que a medida que aumentan las temperaturas, la acumulación térmica y consecuentemente los estados fenológicos se suceden prematuramente.

Teniendo cuenta que el umbral de control fue establecido en 500 °Cd, en condiciones de campo, sería conveniente aplicar los tratamientos de herbicidas cerca de ese límite, medido desde la emergencia de la primera cohorte. De este modo, la segunda cohorte también ya habría emergido y se aprovecharían los fenómenos de mortalidad densodependiente que reducirían naturalmente la cantidad de individuos (Tabla 7 y 8). En función de estos resultados, realizando este tipo de tratamiento con herbicidas post-emergentes, que correspondió a la octava semana desde la emergencia de la primera cohorte; la tercera cohorte aun no habría emergido, lo que requeriría un tratamiento posterior u otra técnica de control adicional, para evitar que los individuos de esta cohorte continúen aportando semillas al banco de semillas, e incrementando los problemas de enmalezamiento en años posteriores.

Se espera que los resultados obtenidos en este estudio puedan contribuir como una base valiosa para mejorar la toma de decisiones y las intervenciones de control dentro de los programas de manejo integrado de malezas.



## **CAPITULO IV**

**CONTROL QUÍMICO: COMPARACIÓN DE  
LA SENSIBILIDAD DE POBLACIONES DE  
*Euphorbia davidii* A GLIFOSATO E  
INFLUENCIA DEL ESTADO NUTRICIONAL  
SOBRE LA EFICACIA DE CONTROL (\*)**

(\*) Parte de la información incluida en este capítulo ha sido publicada: Núñez Fré, F.R.; Juan, V.F.; Yanniccari, M.; Saint André, H.M.; Fernández, R.R. (2018). Comparison of Sensitivity to Glyphosate of *Euphorbia davidii* Populations. *Planta Daninha* **36**, e018164086. Epub March 29, 2017.

## **1. Introducción**

Como se ha mencionado en el capítulo 1, *Euphorbia davidii* Subils (Euphorbiaceae) es una especie invasora, nativa del hemisferio norte (México, Estados Unidos y Canadá), que ha sido recientemente introducida en Sudamérica (Argentina), en Australia y en Europa (Geltman, 2012).

La misma es una maleza anual de ciclo primavero – estival que provoca importantes reducciones de rendimiento en cultivos de soja del centro y sudeste de la provincia de Buenos Aires (Argentina). En esta región, en las últimas dos décadas se viene observando un incremento en la constancia, densidad y en la distribución geográfica de *E. davidii*.

A nivel mundial, poco se conoce acerca de estrategias de manejo para controlar esta especie (Storrie y Cook, 1996). En Argentina los estudios más recientes han indicado la creciente dificultad de control de *E. davidii* utilizando glifosato como herbicida en soja transgénica resistente a glifosato (RR). Se observó la influencia directa del estado fenológico de esta maleza en la eficacia de control obtenida con el mencionado herbicida, destacándose la dificultad creciente para obtener controles superiores al 75% a dosis normales de uso de glifosato a partir del estado de ramificación, y particularmente en el estadio de floración (Juan et al., 2011).

El glifosato (N-fosfonometil glicina) es actualmente el herbicida más utilizado en el mundo y su intensidad de uso en la agricultura ha aumentado notablemente desde la introducción de cultivos resistentes al mismo (Duke, 2018). Esto, si bien por un lado, ha facilitado inicialmente el manejo de malezas en dichos cultivos, por el otro, ha provocado la aparición de numerosos casos de resistencia, como consecuencia de la presión de selección ejercida por el uso recurrente del mismo (Heap y Duke, 2018). Debido a la

intensidad de uso de glifosato era esperable que cada año se desarrollen nuevos biotipos resistentes en especies que eran controladas por este producto (Singh y Shaner, 1998).

Ante esta situación, resulta cada vez más importante la evaluación de la sensibilidad a glifosato de poblaciones de malezas problema, a fin de lograr una rápida detección y caracterización de biotipos resistentes, contribuyendo a facilitar el manejo y evitar su dispersión.

Algunos herbicidas post-emergentes como el glifosato, cuando son aplicados dañan a las plantas sensibles, pero su efecto es relativamente lento; deben pasar varios días antes de que los síntomas del daño se manifiesten visualmente (Duke, 1988). En consecuencia, han sido desarrollados métodos rápidos para detectar el efecto del glifosato (Madsen et al., 1995; Haring et al., 1998), incluyendo metodologías basadas en absorción radicular (Duke y Hoagland, 1978).

Uno de los métodos para la evaluación de sensibilidad a herbicidas consiste en la realización de bioensayos con semillas, en los que los propágulos se disponen sobre un sustrato inerte impregnado con el herbicida, y se determina la respuesta midiendo algún parámetro como supervivencia o germinación (Pérez-Jones et al., 2007).

Otros métodos miden la sensibilidad a los herbicidas directamente sobre el sitio de acción (enzima blanco). Estos en general consisten en la extracción y evaluación *in vitro* de la actividad de enzimas específicas como por ejemplo: la 5-enol piruvil shikimato-3-fosfato sintetasa (EPSPs; EC 2.5.1.19) para glifosato (Singh y Shaner, 1998).

A nivel bioquímico, el modo primario de acción del glifosato es la inhibición de la enzima EPSPs (Rubin et al., 1982). Esto implica el bloqueo de la ruta del shikimato causando reducción en la síntesis de aminoácidos aromáticos, síntesis de proteínas, limitación en el crecimiento y muerte celular prematura (Duke, 1988).

El bloqueo de la ruta del shikimato a partir de la inhibición de esta enzima provoca la acumulación de ácido shikímico, sustrato de la EPSPs (Amrhein et al., 1980; Lydon y Duke, 1988). Por lo tanto, la cuantificación de ácido shikímico ha sido propuesta como un marcador bioquímico para detectar plantas sensibles expuestas a glifosato (Anderson et al., 2001; Brien Henry et al., 2007). En plantas sensibles, incrementos significativos en las concentraciones internas de shikimato ocurren incluso con la aplicación de bajas dosis de glifosato, las cuáles ocasionalmente no causarían fitotoxicidad, ni síntomas de fitotoxicidad visibles (Velini et al., 2008).

La medición de la acumulación de ácido shikímico en respuesta a la inhibición por glifosato es una manera rápida de cuantificar y predecir el daño inducido por este herbicida en plantas sensibles (Harring et al., 1998; Pline et al., 2002; Brien Henry et al., 2007) y además, se ha observado que la acumulación del mismo, en cierto rango es dependiente de la dosis de glifosato aplicada (Lydon y Duke, 1988).

Dado que el glifosato es el herbicida más ampliamente usado en el mundo (comercializado desde 1974) (Benbrook, 2016), y considerando las crecientes dificultades de control de *E. davidii* con este herbicida; se propone como uno de los objetivos del presente capítulo comparar la sensibilidad a glifosato de diferentes poblaciones de *Euphorbia davidii* de la provincia de Buenos Aires (Argentina), a través de diferentes técnicas, las cuales incluyen la determinación de shikimato.

Por otro lado, varios son los factores que afectan la eficacia del glifosato tales como: las condiciones meteorológicas al momento de la aplicación (temperatura, lluvias posteriores), la calidad del agua (pH, dureza, presencia de arcilla o materia orgánica) y el estado fenológico y fisiológico de la maleza (Menéndez et al., 1999). Además, aunque el glifosato es aplicado en post-emergencia de las malezas, su actividad está influenciada

también por las características del suelo en el que crecen las mismas y su contenido de nutrientes (Ncedana, 2011).

Por tratarse de un producto sistémico que se transporta dentro de los vegetales mediante la vía de los fotoasimilados, cualquier factor que limite la absorción o el transporte del producto dentro de la planta, puede hacer disminuir el efecto del glifosato en la maleza (Menéndez et al., 1999).

El fósforo (P) es un importante macronutriente, que constituye cerca del 0,2% del peso seco de las plantas. Es esencial para todos los organismos vivos ya que forma parte de muchos glucofosfatos que participan en la fotosíntesis, la respiración y otros procesos metabólicos; también forma parte de ácidos nucleicos (como ARN y ADN) y de fosfolípidos presentes en las membranas. Asimismo se destaca su participación en el metabolismo energético, debido a su presencia en las moléculas de ATP, ADP, AMP y pirofosfato (PPi) (Salisbury y Ross, 1991). Además forma parte del fosfoenolpiruvato (PEP), intermediario metabólico en la síntesis de aminoácidos aromáticos, que es inhibido competitivamente por la acción del glifosato (Amrhein et al., 1980).

El contenido total de fósforo en el suelo se da en un rango de 0,02 a 0,15 %. En resumen general, es posible encontrar al fósforo de tres formas en el suelo: como fosfato en la solución de suelo; en la superficie de las partículas (minerales u orgánicas), en rápido equilibrio con la solución del suelo (disponible o lábil); o en la fracción indisponible o insoluble que se puede liberar solo muy lentamente y que esta generalmente asociada a los minerales de Fe y Al (Mengel y Kirkby, 2000).

Una cantidad bastante sustancial de este nutriente está asociada con la materia orgánica del suelo (Williams, 1970) y en suelos minerales normalmente la proporción de fósforo orgánico oscila entre el 20 y 80% del total de P. La descomposición de la materia orgánica es un proceso adicional que influencia la disponibilidad de fosfato tanto directa como

indirectamente. La materia orgánica del suelo contiene P de modo que la mineralización de la misma, libera fosfato en la solución de suelo. El fosfato liberado de este modo está involucrado en el equilibrio entre los iones fosfato libres y los adsorbidos. Además, la ruptura de la materia orgánica del suelo por la actividad microbiana está asociada con un aumento de la producción de CO<sub>2</sub>, que incrementa posiblemente la solubilidad de los fosfatos del suelo (Mengel y Kirkby, 2000).

La mayoría de los fosfatos orgánicos del suelo se presentan en forma de ésteres inositol-fosfato, inositol hexafosfatos y en un menor grado inositol tri- y tetrafosfatos. Algunos de estos fosfatos orgánicos se producen por las plantas superiores, la mayoría sin embargo, están sintetizados por los microorganismos (Dalai, 1977).

Las raíces de las plantas son capaces de absorber fosfato de soluciones de concentraciones muy bajas de fosfato (Loneragan y Asher, 1967). Generalmente el contenido de fosfato de las células de raíz y la savia del xilema es cerca de 100 a 1000 veces más alta que en la solución de suelo. Esto demuestra que el fosfato es absorbido por las células de planta en contra de un importante gradiente de concentración.

A medida que las raíces empujan y buscan su camino en el suelo se ponen en contacto con el fosfato de la solución de suelo. Siempre que las raíces tengan una alta demanda de P, y esto es generalmente el caso de las plantas en activo crecimiento, el fosfato se absorbe por las raíces a un elevado ritmo y la solución de suelo en el área cercana a la raíz se vacía de fosfato. Este agotamiento crea un gradiente entre la concentración de fosfato cerca de la superficie de raíz y la concentración de fosfato en el resto del volumen de suelo (Olsen y Watanabe, 1970); este gradiente de concentración regula la velocidad de difusión del fosfato hacia las raíces de las plantas.

Se absorbe sobre todo como el anión monovalente fosfato (H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub><sup>-</sup>) y con menor rapidez como anión divalente (HPO<sub>4</sub><sup>-2</sup>). Gran parte del fosfato se convierte en formas orgánicas

cuando entra a la raíz, o después que es transportado por el xilema hasta el tallo o las hojas (Salisbury y Ross, 1991). El fosfato absorbido por las células de las plantas se ve rápidamente involucrado en procesos metabólicos. Así Jackson y Hagen (1960) informaron que después de un período de solo 10 minutos siguientes a la absorción, 80 % del fosfato absorbido fue incorporado a compuestos orgánicos. Los fosfatos orgánicos formados en este corto tiempo consistieron principalmente en hexosas fosfatos y uridin difosfatos.

El fosfato es muy móvil en la planta y puede ser translocado en dirección hacia arriba o hacia abajo. La mayor parte del fosfato necesario para todo el ciclo de vida de una planta anual, se absorbe durante los primeros estadios de desarrollo; y la nutrición fosforada del resto del follaje y las raíces se realiza mayormente a expensas de la redistribución posterior (Sivori et al., 1980).

La disponibilidad de este nutriente es considerada una de las mayores limitantes al crecimiento de las plantas dado que, a pesar de que la cantidad total contenida en el suelo es relativamente alta, la forma lábil al alcance de la rizosfera suele ser limitada, siendo en muchos cultivos necesaria la aplicación al suelo de fosforo en forma inorgánica para alcanzar la productividad esperada.

Las plantas deficientes en fosforo tienen formas achaparradas y, en contraste con aquellas carentes de nitrógeno, presentan a menudo un color verde bastante oscuro. Las plantas que padecen deficiencia de P tienen un crecimiento retardado y la relación peso seco parte aérea/raíz es generalmente baja (Mengel y Kirkby, 2000). También suelen acumularse antocianinas, que producen una coloración rojiza en la base de los tallos en las plantas herbáceas. En condiciones de deficiencia, el fosforo inorgánico es transportado de los tejidos de la parte aérea a las raíces vía floema (Mimura, 1999; Raghothama, 1999).

Las plantas exhiben un conjunto de cambios fisiológicos, morfológicos y arquitectónicos en las raíces en respuesta a la disponibilidad de fósforo (Lynch, 1997). Las mismas evolucionan y se adaptan a condiciones de baja disponibilidad de fosforo inorgánico en el suelo, con una mayor emisión de pelos radicales y alargamiento de los mismos.

El azufre (S) también es un macronutriente esencial para el crecimiento de las plantas. El mismo se encuentra en el suelo en formas inorgánicas y orgánicas. En la mayoría de los suelos el S orgánico provee el principal reservorio de S (Reisenauer et al., 1973; Scott y Anderson, 1976), y en suelos de turba, éste puede constituir casi el 100 % del total de S. El azufre orgánico del suelo puede dividirse en 2 fracciones: el azufre unido al carbono, y el que no está ligado al carbono. Esta última fracción está constituida por sulfatos fenólicos, colinas así como lípidos (Freney y Stevenson, 1966). El S unido al carbono incluye el S de aminoácidos, aunque estos suelen contabilizar menos de la mitad de esta fracción (Whitehead, 1964).

En los suelos, el azufre se encuentra principalmente en estado oxidado bajo la forma de sulfato ( $\text{SO}_4^{2-}$ ). La disponibilidad del mismo es muy variable en ecosistemas terrestres; desde muy baja en suelos arenosos a extremadamente abundante en suelos originados procedentes de zonas de mareas (Stevenson y Cole, 1999).

Generalmente el contenido de azufre del suelo está vinculado al contenido de materia orgánica, y las transformaciones químicas de las formas de azufre están predominantemente asociadas a la acción de microorganismos (Kertesz y Mirleau, 2004). El contenido de S del total de suelos en regiones templadas está en el rango de 0,005 a 0,04 % (Simon-Sylvestre, 1972). Los niveles totales del suelo dependen del contenido de materia orgánica, así como también de las condiciones climáticas. Los suelos de las regiones templadas poseen generalmente cantidades más altas de S cuanto más materia orgánica contienen.



Las plantas superiores obtienen el S principalmente del suelo en forma de sulfato, el cual es susceptible de lixiviarse; aunque algunas también son capaces de captarlo de la atmósfera, como dióxido de azufre (SO<sub>2</sub>) (Till, 2010). La mayor parte del azufre es absorbido como sulfato, a través del sistema radical, sin embargo, las plantas son incapaces de usarlo en esta forma iónica en la que es absorbido del suelo; debe ser transportado a las hojas donde será reducido. Los cloroplastos en los tejidos verdes, con una abundante disponibilidad de ATP y poder reductor, son los mayores sitios donde ocurre la reducción del sulfato y la incorporación en el aminoácido cisteína (Buchner et al., 2004). A su vez, el aminoácido cisteína puede ser utilizado directamente en la síntesis de proteínas; combinado en glutatión o transformado en metionina. Estos dos aminoácidos forman parte estructural y funcional de proteínas y enzimas, son de vital importancia para los organismos vivos, y en el suelo tienen una función destacada, ya que juntos aportan del 11 al 31 % del azufre orgánico total (Fageria, 2009; Till, 2010). El azufre también forma parte de las ferredoxinas, la CoA, y vitaminas como la biotina y tiamina (Mengel y Kirkby, 2000). Como elemento esencial de las proteínas, la deficiencia de S resulta en una inhibición de la síntesis proteica. Si los aminoácidos de S (cisteína, metionina) que son bloques constructivos esenciales de proteínas son deficientes, las proteínas no pueden sintetizarse. Por esta razón los aminoácidos que no contienen azufre se acumulan en los tejidos de las plantas deficientes en S (Linser et al., 1964).

La falta de azufre en las plantas, ocasiona un desequilibrio a nivel fisiológico, que se ve reflejado a nivel agronómico (Malhi et al., 2005; Soaud, et al., 2011). La adecuada provisión de azufre mantiene la productividad, al coadyuvar en el uso eficiente de otros nutrientes esenciales como lo son el N, P y K (Messick et al., 2005; Amâncio et al., 2009), también mejora la defensa contra el ataque de patógenos (Williams et al., 2002; Kruse et

al., 2005) e incluso es importante para mantener la calidad de los cultivos (Malhi et al., 2005; Till, 2010).

En plantas que padecen deficiencia de S la tasa de crecimiento del cultivo se reduce. Generalmente se afecta más el crecimiento de los macollos que el de la raíz. Frecuentemente las plantas son rígidas y quebradizas y los tallos quedan muy delgados. En contraste con la deficiencia de N, los síntomas cloróticos ocurren primero en las hojas más jóvenes y recientemente formadas. Esto muestra que los tejidos más viejos no pueden contribuir sustancialmente al suministro de S de hojas más jóvenes, que obviamente dependen principalmente del S absorbido por las raíces. El sulfato se transporta principalmente en una dirección hacia arriba (acrópeta) y la capacidad de plantas superiores para mover S en dirección hacia abajo (basípeta) es relativamente pobre (Mengel y Kirkby, 2000).

Las deficiencias de azufre son más probables en los suelos arenosos con bajo nivel de materia orgánica (menos del 2%) y bajo condiciones de alta precipitación. Sin embargo, incluso en suelos con alto contenido de materia orgánica, a menudo, la descomposición de la materia orgánica y el proceso de mineralización no son lo suficientemente rápidos para cumplir con el requerimiento de azufre del cultivo.

Las plantas deficientes en general son más pequeñas y su crecimiento es lento. Aquellas plantas que presentan síntomas de deficiencia nutricional reducen su tasa de expansión foliar y de fotosíntesis (Marschner, 1995), por lo que la producción y migración de fotoasimilados dentro de la planta es menor.

Dado esto, una baja disponibilidad de nutrientes en el suelo podría ser un factor limitante de la eficacia del glifosato. Existen trabajos que muestran que el transporte de glifosato dentro de las plantas se reduce por una menor fotosíntesis causada por estrés de nitrógeno. En cultivos de avena (*Avena sativa* L.) se encontró que herbicidas sistémicos como el

glifosato y fluazifop resultaron menos fitotóxicos en suelos con baja disponibilidad de nitrógeno comparado con suelos con alta disponibilidad de este nutriente (Dickson et al., 1990).

Sin embargo, no en todos los casos se observa esta respuesta ya que Mithila et al. (2008) no encontraron diferencias significativas en el control de *Ambrosia artemisiifolia* en suelos con baja y alta disponibilidad de nitrógeno por lo que indican que la respuesta a la interacción glifosato-nitrógeno en suelo, es especie dependiente.

Al igual que lo documentado para nitrógeno, existen algunas relaciones entre el efecto de herbicidas y el contenido de fósforo. La disponibilidad de este último en el suelo ha sido reportada como un factor que influye en la fitotoxicidad de varios herbicidas. La fitotoxicidad de simazina en soja fue mayor en suelos con niveles altos de fosforo con respecto a bajos niveles (Adams y Russell, 1965). En otra investigación Upchurch et al. (1963), estudiaron la influencia del contenido de fósforo en la fitotoxicidad de varios herbicidas, y solo encontraron evidencias significativas de una mayor fitotoxicidad del herbicida amitrol en suelos con altos niveles de fósforo. Según Rahman (1978) la fitotoxicidad inicial de alaclor en una especie sensible como moha, disminuyó con el aumento de los niveles de fósforo. Wilson y Stewart (1973), por su parte, encontraron interacción entre los niveles de fosforo en el suelo y la dosis aplicada de trifluralina en el crecimiento de raíces de plantas de tomate.

Si bien existen algunos registros sobre las interacciones entre la fitotoxicidad de herbicidas y el nivel de fósforo en el suelo; la totalidad de la información hallada se refiere solo a herbicidas dirigidos al suelo, no habiéndose encontrado antecedentes del estudio de interacciones del nivel nutricional con herbicidas post-emergentes de absorción foliar, como glifosato. En el caso de azufre, no fue posible encontrar bibliografía referida a la interacción del contenido de este nutriente con la acción de herbicidas. Debido a la escases

de información, en el presente capítulo, se pretende también abordar el efecto del contenido de fósforo y azufre en el suelo, en el control de *Euphorbia davidii* con glifosato.

## **2. Materiales y métodos**

### **I) Evaluación de la sensibilidad de diferentes poblaciones de *Euphorbia davidii* a glifosato**

La evaluación de la sensibilidad a glifosato de poblaciones de *E. davidii* de distintas procedencias se realizó a través de dos pruebas: i) bioensayo de sensibilidad a glifosato en germinación y ii) cuantificación de shikimato.

#### *Material vegetal utilizado*

Las semillas de *E. davidii* utilizadas para ambas determinaciones fueron recolectadas de poblaciones aisladas de diferentes localidades de la provincia de Buenos Aires, República Argentina: Espartillar (37°21'40"S 62°26'10"O); Olavarría (36°57'55.8648"S 60° 11' 55.7448"O); Azul (36° 49' 51.9276"S 59°52'44.2878"O); y Barrow (38°18'00"S60°14'00"O).

#### **i. Bioensayo de sensibilidad a glifosato en germinación**

Se evaluó la germinación de semillas de las distintas poblaciones de *E. davidii* en concentraciones crecientes de glifosato. Para ello se colocaron 30 semillas por caja de Petri con papel de filtro y una alícuota de 5 ml de soluciones de glifosato (sal amónica 40,5% SL, 356 g e.a. l<sup>-1</sup>) en agua destilada a razón de 0; 2,24; 4,47; 6,72; 8,95; 17,91;

35,82 y 71,64 g e.a. l<sup>-1</sup> utilizando 3 repeticiones. Se incubaron en cámara de cultivo a 18°C ± 1°C y se realizaron recuentos del número de semillas germinadas por tratamiento a los 21 días. Por medio del modelo log-logístico propuesto por Streibig et al. (1993), se calculó la concentración efectiva media (CE<sub>50</sub>) que es la concentración del herbicida necesaria para inhibir al 50% el porcentaje de germinación con respecto al testigo. En base a las CE<sub>50</sub> se calcularon los índices de resistencia (IR) para las diferentes procedencias, realizando el cociente entre la CE<sub>50</sub> de cada localidad y la CE<sub>50</sub> correspondiente a la población de mayor sensibilidad (Yanniccari et al., 2012), que en este estudio fue considerada la población de Espartillar, que cuenta con menor historia de uso de glifosato.

**ii. Ensayo de cuantificación de shikimato como bioindicador de la sensibilidad a glifosato**

Diez semillas de cada población fueron sembradas en macetas de 600 cm<sup>3</sup> de capacidad, con suelo Argiudol típico de textura franco-arcillosa y las plantas fueron mantenidas en condiciones semi-controladas en invernadero. A la semana de la emergencia se realizó un raleo manual, dejando cuatro plantas por maceta. Cuando las mismas alcanzaron el estado fenológico de inicio de ramificación, se realizó la aplicación de glifosato (sal amónica 40,5% SL), a dosis 0X; 0,5X y 1X que corresponden a 0, 540 y 1080 g e.a. ha<sup>-1</sup>, siendo X la dosis normal de uso recomendada para el control de esta especie en el estado fenológico mencionado (Juan et al., 2011). Estos tratamientos se realizaron en condiciones de laboratorio, utilizando un equipo de aplicación de presión constante CO<sub>2</sub>, ajustada a 3 bares, pastillas abanico plano 8001, con un caudal equivalente a 130 l ha<sup>-1</sup>, y empleando tres repeticiones por tratamiento y población. A las 72 h de realizada la

aplicación, se tomaron muestras de 0,05 g de peso fresco del último par de hojas completamente expandidas para realizar la cuantificación de shikimato.

#### *Extracción de shikimato*

La extracción se realizó utilizando la técnica descrita por Singh y Shaner (1998). Inmediatamente después de la toma de cada muestra, el material vegetal fue sumergido en HCl (0,25N) en relación 1:20 (peso del tejido/volumen de HCl). Luego se molió cada muestra en un mortero y seguidamente el extracto obtenido fue centrifugado. El sobrenadante fue colectado y se empleó directamente para la determinación de shikimato como se describe a continuación.

#### *Determinación espectrofotométrica de shikimato*

El shikimato fue determinado de acuerdo a una modificación del método de Gaitonde y Gordon (1958). A una alícuota del sobrenadante obtenido de cada muestra (10 a 50  $\mu$ l, dependiendo de la cantidad de shikimato presente en el extracto) se le agregó 0,8 ml de una solución de 1 % de ácido peryódico y se incubaron a 40°C durante 45 minutos para oxidar el ácido shikímico. Posteriormente, se agregó 0,8 ml de NaOH (1N)/Na<sub>2</sub>SO<sub>3</sub> (0,05M). Finalmente, se midió la absorbancia a 382 nm de longitud de onda empleando un espectrofotómetro (Shimadzu UV-160A). Se determinó la concentración de shikimato de cada muestra a partir de la elaboración de una curva patrón de shikimato (99%, Sigma Aldrich).

*Análisis estadístico*

Con los datos del bioensayo de germinación de las semillas de cada procedencia, se ajustaron modelos de regresión no lineal (log-logístico) a partir de la ecuación dosis-respuesta (Seefeldt et al., 1995), relacionando el porcentaje de germinación y la concentración de glifosato. Para ello se empleó el software estadístico GraphPad Prism v 6.01.

La expresión matemática utilizada para este ajuste se expresa como:  $Y = C + ((D-C) / (1+\exp(b \cdot \ln(X)-\ln(CE_{50}+1))))$ ; donde Y representa el porcentaje de germinación, X es la concentración de glifosato expresada en g e.a. l<sup>-1</sup>; C es límite inferior; D es el límite superior; b representa la pendiente y CE<sub>50</sub> es la concentración efectiva media que es la concentración a la cual se obtiene un 50% de inhibición en la germinación.

Además los datos obtenidos del bioensayo de germinación, y de las determinaciones de shikimato se evaluaron mediante análisis de varianza, utilizando un diseño completamente al azar. Se realizó la comparación de medias, mediante el test de Tukey p <0,05, utilizando software estadístico InfoStat v. 2012 (Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina). En el caso de los datos obtenidos de las determinaciones de shikimato, además se realizaron comparaciones de medias, agrupados por procedencia.

## II) **Influencia del estado nutricional de *E. davidii* en el control con glifosato: fósforo y azufre**

En esta parte del estudio se realizaron dos ensayos independientes, uno con cada nutriente, en condiciones semi-controladas de humedad y temperaturas en el invernadero de la Facultad de Agronomía de la Universidad Nacional del Centro de la provincia de Buenos Aires.

El suelo utilizado para los dos ensayos fue obtenido del horizonte A de textura franco arenosa, de un lote ubicado en el partido de Bolívar, provincia de Buenos Aires (36°33'26.0"S 61°02'02.4"W). El mismo fue extraído de dos sectores de un mismo establecimiento, y analizado previo al comienzo de cada uno de los ensayos; y los resultados de dichos análisis se presentan en la Tabla 10.

En el ensayo de fósforo (i), para establecer los distintos niveles de este nutriente, se agregó la fuente  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  para aumentar el P disponible a 5, 10 y 15 ppm, y los tratamientos fueron definidos como: P “bajo” (5 ppm), P “medio” (10 ppm) y P “alto” (15 ppm) y el nivel de nitrógeno se homogenizó a 40 ppm  $\text{NO}_3^-$  utilizando  $\text{KNO}_3$ . La incorporación de estos nutrientes se realizó mediante la pulverización del suelo extendido sobre una manta plástica, con una solución conteniendo la cantidad calculada de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  y  $\text{KNO}_3$ , para obtener una concentración de nutrientes homogénea en toda la muestra. En este caso no se modificó el nivel de azufre, ya que se consideró adecuado para el crecimiento de *E. davidii*.

En el ensayo de azufre (ii), se ajustaron los niveles de fósforo a 15 ppm P utilizando  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , y el nivel de nitrógeno nuevamente se homogeneizó a 40 ppm  $\text{NO}_3^-$  incorporando  $\text{KNO}_3$ . La cantidad de  $\text{NO}_3^-$  agregado se calculó sustrayendo la cantidad de N aportado por el  $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$ . Los niveles de azufre fueron definidos como “bajo” (5 ppm



SO<sub>4</sub><sup>-2</sup>), “medio” (10 ppm SO<sub>4</sub><sup>-2</sup>), y “alto” (15 ppm SO<sub>4</sub><sup>-2</sup>), mediante el agregado de SO<sub>4</sub>(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>. La incorporación de los mismos se realizó mediante pulverización de una solución acuosa sobre las muestras de suelo, de igual manera que en el ensayo de fósforo.

Tabla 10. Resultados de los análisis de las muestras extraídas de suelo, previo a su utilización para los ensayos correspondientes de fósforo y azufre.

Ensayo	% MO	pH	Nitratos (NO <sub>3</sub> ppm)	Fósforo Bray (ppm)	Sulfatos (SO <sub>4</sub> <sup>-2</sup> ppm)
Fósforo (i)	4,6	6,4	31,3	5	8
Azufre (ii)	3,8	6,9	14,1	3	5

Una vez ajustado el nivel de P y/o de S en el suelo, este sustrato fue distribuido en macetas de 600 cm<sup>3</sup> de capacidad en las cuales se sembraron 30 semillas de *E. davidii* obtenidas en el partido de Olavarría. Las macetas fueron dispuestas en el invernáculo, mantenidas en capacidad de campo y luego de la emergencia se realizó el raleo dejando cinco individuos por maceta uniformemente distribuidos.

Antes de que las plantas comiencen a ramificar, se realizaron los tratamientos con el herbicida glifosato (sal amónica 40,5% SL, 356 g e.a. l<sup>-1</sup>) en condiciones de laboratorio (cámara de pulverización). Se aplicaron las diferentes dosis (0, 2, 3 y 4 l ha<sup>-1</sup>, que corresponden a 0, 712, 1068 y 1424 g e.a. ha<sup>-1</sup>) mediante un equipo de CO<sub>2</sub> con una presión constante de 3 bares, equipado con una pastilla de aspersion de abanico plano estándar 8001 con un caudal equivalente a 130 l ha<sup>-1</sup>.

A los 7, 14, y 21 días desde aplicación (DDA) se realizaron los relevamientos de fitotoxicidad según una escala de evaluación visual de la acción de herbicidas donde 0% corresponde a la ausencia de síntomas, y 100% es la muerte total de las plantas.

A los 28 DDA se procedió a cortar las plantas al ras del suelo y llevar a cámara de secado a 60°C durante 3 días para determinar la biomasa seca aérea. En el caso del ensayo de

azufre se realizó una evaluación más de fitotoxicidad, ya que se observaron algunos cambios visuales significativos.

Los resultados fueron analizados mediante ANOVA en un diseño completamente al azar, y se realizaron comparaciones de medias mediante el test de Tukey ( $p < 0,05$ ), utilizando software estadístico InfoStat v.2012 (Universidad Nacional de Córdoba, Argentina).

### **3. Resultados y discusión**

#### **i. Bioensayo de sensibilidad a glifosato en germinación**

A partir del bioensayo de semillas, se determinó que ninguna de las poblaciones evaluadas resultó sensible a glifosato a la concentración de 2,24 g e.a. l<sup>-1</sup>. En efecto, el porcentaje de germinación de las semillas expuestas a esta concentración, no se diferenció del testigo en ninguna de las cuatro poblaciones de *E. davidii* evaluadas (Tabla 11).

La concentración mínima a la cual se obtuvo una respuesta estadísticamente significativa fue dependiente de las poblaciones estudiadas, mostrando diferencias en la sensibilidad.

La población de Espartillar resultó ser la más sensible, hallándose una respuesta estadísticamente significativa con respecto al testigo a partir de la concentración de 4,47 g e.a. l<sup>-1</sup>. En el caso de las semillas provenientes de Azul, existió un efecto inhibitorio a partir de la concentración de 6,72 g e.a. l<sup>-1</sup> y las poblaciones de Olavarría y Barrow sólo mostraron una disminución en los porcentajes de germinación a concentraciones iguales o superiores a 8,95 g e.a. l<sup>-1</sup>.

Tabla 11. Porcentaje de germinación promedio de semillas de *Euphorbia davidii* obtenido a los 21 días, en las diferentes concentraciones de glifosato evaluadas, para cada población procedente de las localidades de Espartillar, Azul, Olavarría y Barrow. Las comparaciones estadísticas presentadas son sólo válidas dentro de cada población. Las diferentes letras indican significancia estadística por medio del test de Tukey ( $p < 0,05$ ).

[Glifosato g e.a. l <sup>-1</sup> ]	Espartillar	Azul	Olavarría	Barrow
0	97,5 a	40,0 a	96,7 a	95,6 a
2,24	97,5 a	38,3 a	94,4 a	93,3 a
4,47	43,8 b	38,3 a	94,4 a	93,3 a
6,72	33,8 b	28,3 b	90,0 a	93,3 a
8,95	5,0 c	11,7 c	58,9 b	74,4 b
17,91	6,3 c	0,0 d	16,7 c	5,6 c
35,82	0,0 c	0,0 d	0,0 d	0,0 c
71,64	0,0 c	0,0 d	0,0 d	0,0 c

Por otra parte, evaluando el comportamiento de las diferentes poblaciones en concentraciones mayores de glifosato, se pudo apreciar que para alcanzar una inhibición de la germinación mayor a un 90%, fue necesaria una concentración mínima de 8,95 g e.a. l<sup>-1</sup> para la población de Espartillar; 17,91 g e.a. l<sup>-1</sup> para las de Azul y Barrow y 35,82 g e.a. l<sup>-1</sup> en el caso de aquella proveniente de Olavarría.

En la figura 13 se presentan los ajustes del modelo de regresión no lineal obtenidos en base al porcentaje de germinación de cada población y la concentración de glifosato. En base a las ecuaciones ajustadas se calculó la concentración efectiva media (Tabla 12).

Allí se observa que el menor valor obtenido en este parámetro corresponde a la población de Espartillar (4 g e.a. l<sup>-1</sup>), reafirmando que se trata de la población más sensible. Con las semillas de Azul se obtuvo una CE<sub>50</sub> un 75% mayor que la población anterior (7,03 g e.a.

l<sup>-1</sup>). Las CE<sub>50</sub> de las dos poblaciones restantes (Barrow y Olavarría) resultaron estadísticamente mayores que las mencionadas para Azul y Espartillar, pero entre sí (Barrow y Olavarría) no se detectaron diferencias significativas.

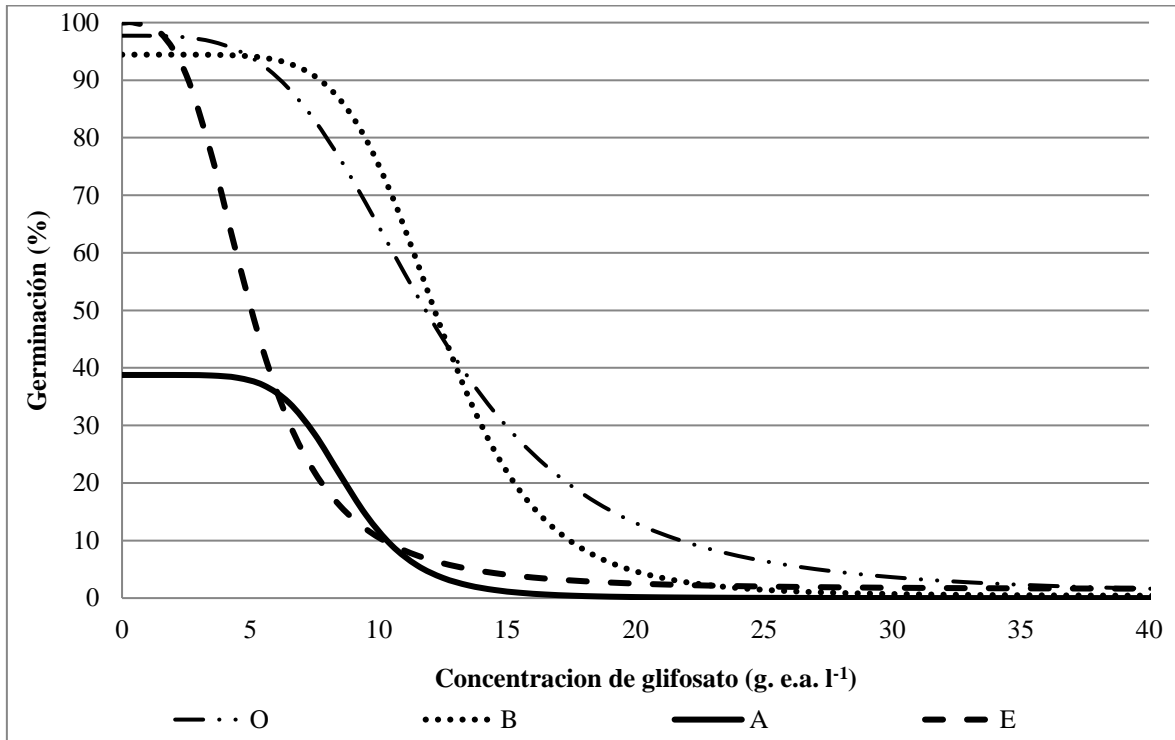


Figura 13. Relación log-logística entre la germinación (%) y las concentraciones de glifosato evaluadas de *Euphorbia davidii* procedentes de las localidades de Espartillar (E), Azul (A), Olavarría (O) y Barrow (B). Los valores de  $r^2$  obtenidos fueron de 0,912; 0,940; 0,966 y 0,995 respectivamente.

Espartillar es una localidad principalmente ganadera que se encuentra situada en una región al sudoeste de la provincia de Buenos Aires, donde el 58 % de los suelos posee aptitud ganadero-agrícola, que admiten una rotación con una fase agrícola relativamente corta, luego de un período prolongado con pasturas perennes; un 28 % de los suelos tiene aptitud agrícola-ganadera y el 14 % restante tiene aptitud netamente ganadera (Cappello y Fortunato, 2013).

Tabla 12. Concentración efectiva media ( $CE_{50}$ ) obtenidas de las ecuaciones de ajuste del modelo log-logístico, para el parámetro porcentaje de germinación de semillas de *Euphorbia davidii*, procedente de las localidades de Espartillar, Azul, Olavarría y Barrow. Se incluyen los límites inferior y superior del intervalo de confianza  $p > 0,95$ .

Población	$CE_{50}$ (g. e.a. l <sup>-1</sup> )	Intervalo de Confianza	
		Límite inferior	Límite superior
Espartillar	4,00c	3,05	5,23
Azul	7,03b	6,37	7,77
Olavarría	9,57a	8,27	11,08
Barrow	9,93a	9,28	10,65

Asumiendo que por la historia agrícola de la zona y de uso del herbicida glifosato, la población de Espartillar fue la menos expuesta a la presión de selección, es lógico que las plantas provenientes de esa localidad representen una población sensible y se podría suponer que las mismas presentan la susceptibilidad original de esta especie a glifosato. Los índices de resistencia (IR) obtenidos comparando la  $CE_{50}$  de las localidades de Azul, Olavarría y Barrow respecto de la  $CE_{50}$  de la población sensible (Espartillar) fueron: 1,76; 2,39 y 2,48 respectivamente.

En comparación a otros casos de resistencia a glifosato en otras especies, los valores de IR obtenidos son relativamente bajos (<5). Estos valores, podrían indicar que existe variabilidad genética entre poblaciones en cuanto a la sensibilidad a glifosato. El incremento en la frecuencia de aplicaciones y uso de glifosato en la región ha actuado y aún estaría sometiendo a las poblaciones de *Euphorbia davidii* a una creciente presión de selección. Esto favorecería el incremento de la frecuencia de individuos menos sensibles al herbicida y forzaría a la población a evolucionar a un mayor IR.

Por otra parte, si bien todas las poblaciones ajustan a un mismo modelo; es posible analizar por separado los parámetros que determinan cada ecuación de ajuste.

Tabla 13. Pendientes (b) obtenidas de las ecuaciones de ajuste del modelo log-logístico, para el parámetro porcentaje de germinación de semillas de *Euphorbia davidii*, procedente de las localidades de Espartillar, Azul, Olavarría y Barrow. Se incluyen los límites inferior y superior del intervalo de confianza  $p > 0,95$ .

Población	Pendiente (b)	Intervalo de Confianza	
		Límite inferior	Límite superior
Espartillar	-3,31	-5,56	-1,06
Azul	-6,52	-10,34	-2,70
Olavarría	-3,71	-5,28	-2,14
Barrow	-6,35	-8,09	-4,62

Como se observa en la tabla 13, si bien las ecuaciones de ajuste presentan diferentes valores de pendiente, no fue posible establecer diferencias estadísticamente significativas entre ellos, debido a la variabilidad de los datos observados; lo cual se manifiesta en el solapamiento de los intervalos de confianza ( $p > 0,95$ ) presentados. Teniendo en cuenta, que no es posible diferenciar las pendientes de ajuste, se puede afirmar que no existe una sensibilidad diferente en la germinación frente a un incremento en la concentración de glifosato, en la fase lineal del modelo ajustado. Las diferencias observadas en las poblaciones ( $CE_{50}$ ), solo implicarían un desplazamiento horizontal de la curva concentración-respuesta, sin variar la forma de la misma. Por lo tanto, el incremento en una unidad de concentración de glifosato evaluada, implicaría un cambio de respuesta equivalente en todas las poblaciones.

## **ii. Ensayo de cuantificación de shikimato como bioindicador de la sensibilidad a glifosato**

La concentración de shikimato registrada en las plantas testigo de las poblaciones estudiadas (sin aplicación de herbicida glifosato), osciló entre 22000 a 37000  $\mu\text{g g}^{-1}$  de peso fresco para las diferentes poblaciones evaluadas, y no se observaron diferencias desde el punto de vista estadístico entre los testigos de las diferentes localidades. Los coeficientes de variación para las determinaciones de shikimato en los tratamientos testigo fueron: 77,2; 42,3; 96,4; y 34,1% para las poblaciones de Espartillar, Barrow, Azul y Olavarría respectivamente, lo cual evidencia una marcada variabilidad en los niveles basales de shikimato de las diferentes poblaciones (Tabla 14).

Se destaca que en la población de Espartillar la concentración de shikimato determinada en plantas tratadas con glifosato resultó ser el doble con respecto al testigo cuando se aplicó la menor dosis de herbicida (0,5X) y el triple cuando se utilizó la dosis recomendada para el control de esta especie (1X). Esto pone en evidencia que la mencionada población presenta una alta sensibilidad al herbicida, en consistencia a lo observado en los resultados del bioensayo con semillas en el cual la germinación fue inhibida por una baja concentración de glifosato.

En las poblaciones de Azul, Olavarría y Barrow, no se detectaron diferencias estadísticamente significativas en la concentración de shikimato registrada para los tratamientos de glifosato 0X, 0,5X y 1X.

Tabla 14. Concentración de shikimato en hojas de *Euphorbia davidii* ( $\mu\text{g}$  de shikimato  $\text{g}^{-1}$  de peso fresco) determinado 72 horas luego de la aplicación de las diferentes dosis de glifosato (0, 540 y 1080 g e.a.  $\text{ha}^{-1}$ ). Se expresan valores medios, los desvíos estándar y el coeficiente de variación (CV). Las letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas entre las medias según el test de Tukey ( $p < 0,05$ ).

Población	Dosis	[Shikimato]	Desvío	CV (%)	En conjunto	Análisis por localidad
	(g e.a $\text{ha}^{-1}$ )	Promedio	Estándar			
Espartillar	0	22433	17321	77,2	AB	A
Espartillar	540	46118	23163	50,2	DE	AB
Espartillar	1080	62952	37747	60,0	E	B
Azul	0	24341	23464	96,4	ABCD	A
Azul	540	12046	10460	86,8	A	A
Azul	1080	9808	5693	58,1	A	A
Olavarría	0	37463	12763	34,1	BCD	A
Olavarría	540	45645	14088	30,9	CDE	A
Olavarría	1080	36043	22734	63,1	BCD	A
Barrow	0	25257	10674	42,3	ABCD	A
Barrow	540	23637	10624	44,9	ABC	A
Barrow	1080	26288	22028	83,8	ABCD	A

En estas poblaciones la ausencia de acumulación de shikimato, evidencia la baja sensibilidad al herbicida. Pese a esto, en algunas circunstancias es posible encontrar acumulación de shikimato tanto en poblaciones susceptibles como en resistentes a glifosato, no obstante, en esos casos se ha observado un patrón diferencial de acumulación de shikimato a lo largo del tiempo (Mueller et al., 2003). Es posible que exista un patrón de acumulación diferencial de shikimato a lo largo del tiempo post-aplicación, entre las tres poblaciones de *E. davidii* que no presentaron respuesta a la aplicación de glifosato (Azul, Olavarría y Barrow) y que esto se asocie a distinta sensibilidad al herbicida, lo cual



debería ser evaluado en investigaciones posteriores ya que los resultados de este trabajo corresponden a determinaciones realizadas a las 72 h post aplicación.

Las concentraciones de shikimato en los tratamientos testigo de todas las poblaciones de *E. davidii* utilizadas, resultaron muy superiores a las observadas en otras especies de malezas. Yanniccari et al. (2012) encontraron en promedio 500  $\mu\text{g}$  de shikimato  $\text{g}^{-1}$  de peso fresco en plantas de *Lolium perenne* L. susceptibles y 1000 a 2000  $\mu\text{g}$   $\text{g}^{-1}$  de peso fresco en biotipos resistentes a glifosato, lo cual es un valor al menos diez veces menor al registrado en *E. davidii*.

En general, los niveles endógenos de shikimato en plantas son muy bajos, entre 40 y 60  $\mu\text{g}$   $\text{g}^{-1}$  de peso fresco (Yoshida et al., 1975), pero se sabe que el nivel basal de shikimato es variable de acuerdo a las especies estudiadas. Mueller et al. (2008) encontraron niveles basales promedio de 100  $\mu\text{g}$  de shikimato  $\text{g}^{-1}$  de peso fresco en poblaciones de nueve especies evaluadas, y concentraciones entre 1000 y 6000  $\mu\text{g}$  de shikimato  $\text{g}^{-1}$  de peso fresco en plantas tratadas con glifosato.

Doğramaci et al. (2015), reportan que la concentración de shikimato en poblaciones de *Euphorbia esula* sin aplicación de glifosato fue de 50000  $\mu\text{g}$  de shikimato  $\text{g}^{-1}$  de peso fresco, mientras que detectaron incrementos hasta 120000  $\mu\text{g}$  de shikimato  $\text{g}^{-1}$  de peso fresco, en plantas sensibles tratadas con glifosato.

De acuerdo a esto, se presume que altas concentraciones de shikimato podrían estar asociadas a especies del género *Euphorbia* y a su vez se destaca la baja respuesta en la acumulación de este metabolito luego de un tratamiento con glifosato. En algunas especies sensibles de otros géneros tratadas con el herbicida, el nivel de shikimato aumenta hasta 10 veces respecto de las plantas no tratadas, mientras que en la población sensible de *E. davidii* en el presente ensayo sólo se triplicó.

Por otra parte, Haring et al. (1998), encontraron diferencias en la acumulación de shikimato para diferentes formulaciones de glifosato utilizado, lo cual debería ser considerado al comparar resultados obtenidos en diferentes evaluaciones.

Cualquiera sea el o los mecanismos que provoquen la baja sensibilidad a glifosato de las poblaciones de Azul, Olavarría y Barrow, el impacto que esto tiene en condiciones de campo es similar: una mayor dificultad de control e instintivamente un incremento de las dosis normales de uso del herbicida glifosato por parte de técnicos y productores, que a su vez redundan en mayor presión de selección (Juan et al., 2011).

En función de los resultados aquí presentados, y considerando antecedentes que indican diferencias en la sensibilidad a glifosato para poblaciones de otra especie del mismo género como es *E. heterophylla* (Vidal et al., 2007), se alerta sobre el riesgo de evolución a un mayor nivel de resistencia en la región en cuestión.

En este estudio los dos ensayos de evaluación de la sensibilidad a glifosato de las poblaciones, mostraron resultados concordantes que indican que las plantas obtenidas de semillas recolectadas en Espartillar fueron más sensibles a glifosato respecto de las colectadas en otras localidades. Si bien el IR calculado no es demasiado elevado ( $<5$ ), ya nos indica una sensibilidad diferencial entre las poblaciones que debería ser tenido en cuenta dado que se trata de una maleza invasora que tiene poca historia de existencia en la zona centro de la provincia de Buenos Aires.

## **II) Influencia del estado nutricional de *E. davidii* en el control con glifosato: fósforo y azufre**

### *Influencia de diferentes niveles de fósforo en el suelo sobre la eficacia de control de *Euphorbia davidii* con glifosato*

En primer lugar, al analizar la fitotoxicidad según la escala visual propuesta, se puede apreciar que existe una tendencia a manifestarse una mayor fitotoxicidad a medida que se incrementó la dosis de glifosato evaluada, tal como era esperable. Además, se observaron diferencias en la fitotoxicidad de un mismo tratamiento de acuerdo a la fecha de evaluación, alcanzándose la fitotoxicidad máxima en la mayoría de los casos a 21 DDA (Figura 14, 15 y 16).

En el caso del nivel evaluado de bajo fósforo (Figura 14), a los 7 DDA todos los tratamientos evidenciaron porcentajes de fitotoxicidad leves, que incluso a la mayor dosis evaluada no superó el 30%. A los 14 DDA las dosis de 2 y 3 l ha<sup>-1</sup> incrementaron su fitotoxicidad hasta valores de aproximadamente un 60%, no obstante, no se diferenciaron de la dosis más alta donde se observó mortalidad total de las plantas (fitotoxicidad del 100%). En la última evaluación (21 DDA), la dosis más alta conservó el máximo valor de fitotoxicidad, mientras que las menores dosis manifestaron un incremento en la fitotoxicidad hasta valores alrededor del 75%.

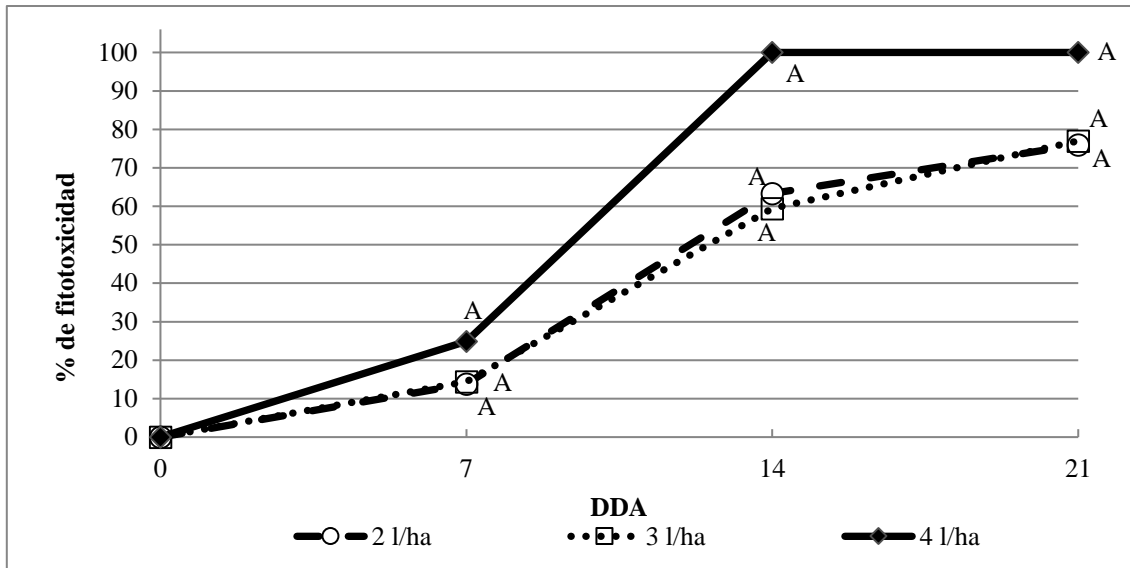


Figura 14. Evolución de la fitotoxicidad para los diferentes momentos de evaluación, en las dosis de 2, 3 y 4 l ha<sup>-1</sup> de glifosato, para el nivel bajo de fósforo. Las comparaciones son sólo validas dentro de cada fecha. Las letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas según el test de Tukey ( $p < 0,05$ ).

En el nivel medio de fósforo (Figura 15), el comportamiento fue diferente al caso anterior. A los 7 DDA, se observaron diferencias estadísticamente significativas entre la dosis de 4 l ha<sup>-1</sup> (que alcanzó una fitotoxicidad cercana el 50%), y las dosis menores cuyas fitotoxicidades no superaron el 25%. A los 14 DDA, se observó un incremento notable de la fitotoxicidad en todos los tratamientos alcanzando valores de aproximadamente 80, 90 y 100 %, para las dosis de 2, 3 y 4 l ha<sup>-1</sup> respectivamente. A los 21 DDA, todos los tratamientos manifestaron fitotoxicidades iguales o superiores al 90%, no detectándose diferencias significativas entre ellos.

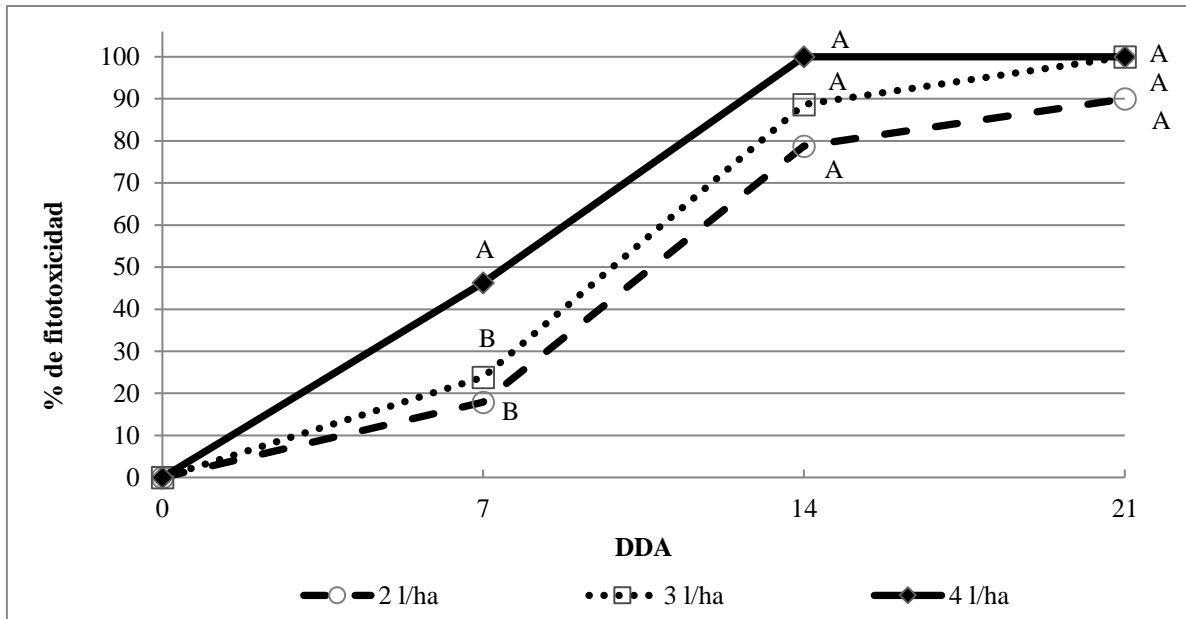


Figura 15. Evolución de la fitotoxicidad para los diferentes momentos de evaluación, en las dosis de 2, 3 y 4 l ha<sup>-1</sup> de glifosato, para el nivel medio de fósforo. Las comparaciones son sólo válidas dentro de cada fecha. Las letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas según el test de Tukey ( $p < 0,05$ ).

En el nivel alto de fósforo (Figura 16), nuevamente se detectaron diferencias significativas en la primera evaluación. La dosis de 4 l ha<sup>-1</sup> manifestó una fitotoxicidad de aproximadamente un 45%, diferenciándose de la dosis de 2 l ha<sup>-1</sup>, donde la misma fue menor al 20%. La dosis de 3 l ha<sup>-1</sup> presentó una fitotoxicidad de un 35% no diferenciándose a su vez de ninguna de las otras dosis evaluadas. A los 14 DDA, la fitotoxicidad se incrementó rápidamente en todos los tratamientos, alcanzando el 100% en las dosis de 3 y 4 l ha<sup>-1</sup>. Sin embargo, no pudieron diferenciarse de la menor dosis, que solo presentó una fitotoxicidad del 75%. En la última evaluación no se observó ningún cambio respecto a la evaluación inmediatamente anterior.

Si bien en todos los niveles de fósforo evaluados, al finalizar el ensayo todos los tratamientos alcanzaron fitotoxicidades similares; es posible observar una diferencia en el ritmo de presentación de los síntomas. En el nivel bajo de fósforo todas las dosis

evaluadas necesitaron al menos 14 días para alcanzar un 50% de fitotoxicidad; mientras que en los niveles medios y altos de fósforo, la dosis más alta alcanzó un valor cercano al 50% de fitotoxicidad a los 7 DDA, mientras que las dosis de 2 y 3 l ha<sup>-1</sup> necesitaron 14 días. Posiblemente la mayor disponibilidad de fósforo para la maleza, permitiría movilizar más rápidamente el herbicida hasta el sitio de acción, dando como resultado la manifestación de síntomas en forma más prematura.

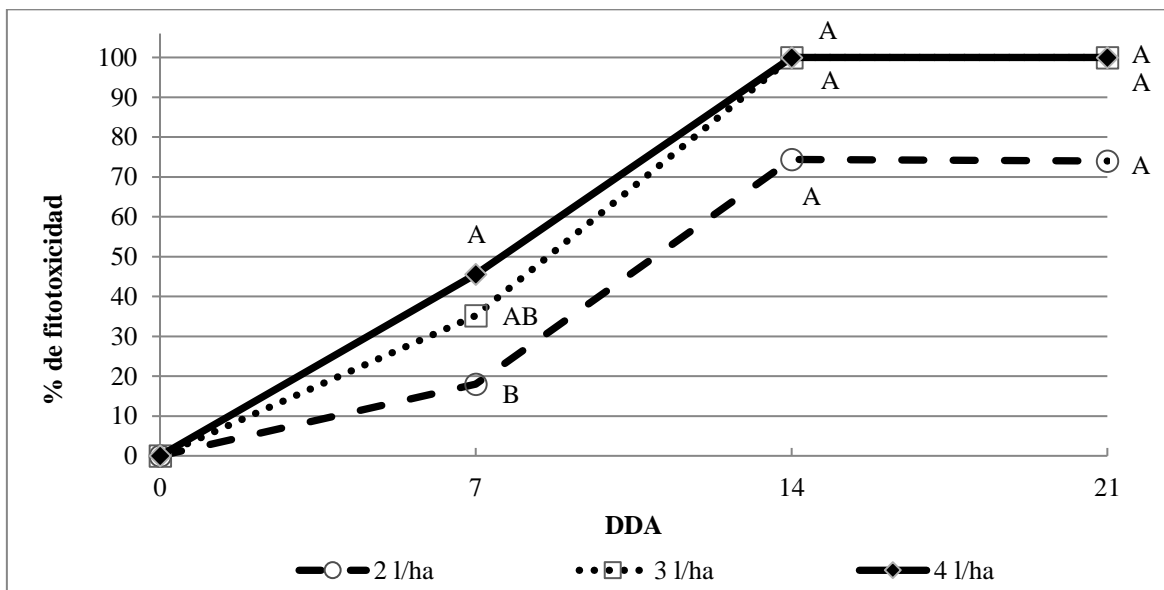


Figura 16. Evolución de la fitotoxicidad para los diferentes momentos de evaluación, en las dosis de 2, 3 y 4 l ha<sup>-1</sup> de glifosato, para el nivel alto de fósforo. Las comparaciones son sólo validas dentro de cada fecha. Las letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas según el test de Tukey ( $p < 0,05$ ).

Con respecto al PS, en primer lugar se puede apreciar que se observa una disminución en la acumulación de peso seco a medida que se incrementa la dosis en todos los niveles de fósforo evaluados (Figura 17).

En el nivel alto de fósforo, la dosis de 2 l ha<sup>-1</sup> causó una reducción del PS de aproximadamente 50%. Las dosis de 3 y 4 l ha<sup>-1</sup> provocaron reducciones del PS superiores al 65% y no se diferenciaron entre sí.

Con respecto al nivel medio de fósforo, todas las dosis se diferenciaron del tratamiento testigo causando reducciones en la acumulación de PS superiores al 70%. En este caso, no se observaron diferencias significativas entre ninguna de las dosis de glifosato evaluadas.

En el caso del nivel bajo de fósforo, las dosis de 2 y 3 l ha<sup>-1</sup> permitieron acumular en promedio solo un 30% del PS respecto al testigo, diferenciándose estadísticamente de éste.

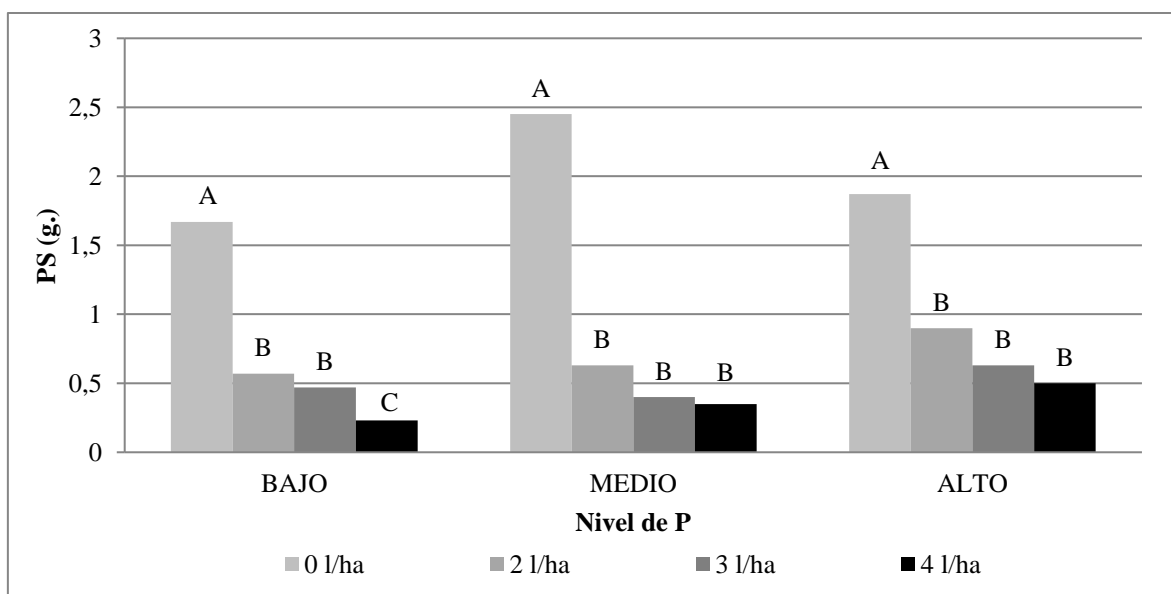


Figura 17. Peso seco registrado a los 28 DDA para los diferentes niveles de fósforo, en las dosis de 2, 3 y 4 l ha<sup>-1</sup> de glifosato. Las comparaciones son sólo válidas dentro de cada nivel de fósforo. Las letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas según el test de Tukey ( $p < 0,05$ ).

Por otra parte, la mayor dosis evaluada se diferenció de las restantes, causando una reducción en la acumulación de PS superior al 80%.

Podemos evidenciar una influencia en el nivel nutricional de fósforo, en el control de esta maleza con glifosato. Si consideramos como umbral de comparación un 70% de reducción de PS respecto al testigo, se puede apreciar que esto se consigue solo con la

dosis de 4 l ha<sup>-1</sup> en el nivel alto de fósforo; con las dosis de 3 y 4 l ha<sup>-1</sup> en nivel de fósforo bajo, y con todas las dosis en el nivel de fósforo medio.

*Influencia de diferentes niveles de azufre en el suelo sobre la eficacia de control de Euphorbia davidii con glifosato*

En el caso del ensayo con diferentes niveles de azufre, en primer lugar se puede observar un incremento en la respuesta a fitotoxicidad a medida que se incrementa la dosis aplicada y el tiempo de evaluación desde la aplicación.

En el nivel bajo de azufre a los 7 DDA (Figura 18), no se registraron diferencias significativas entre los tratamientos aplicados, la mayor dosis alcanzó una fitotoxicidad del 40%, mientras que las dosis de 2 y 3 l ha<sup>-1</sup> solo presentaron fitotoxicidad leve (alrededor del 20%).

Posteriormente se observa un incremento lineal de la fitotoxicidad en las dosis de 3 y 4 l ha<sup>-1</sup>, llegando a valores de fitotoxicidad de 67 y 85% respectivamente a los 21 DDA. La menor dosis evaluada presentó un incremento más moderado de la fitotoxicidad llegando al 40% a la misma fecha de evaluación, y no se diferenció del resto de los tratamientos. Sin embargo, en la última evaluación a los 28 DDA, la menor dosis solo presentó un 50% de fitotoxicidad, diferenciándose de las otras restantes que superaron el 90%.



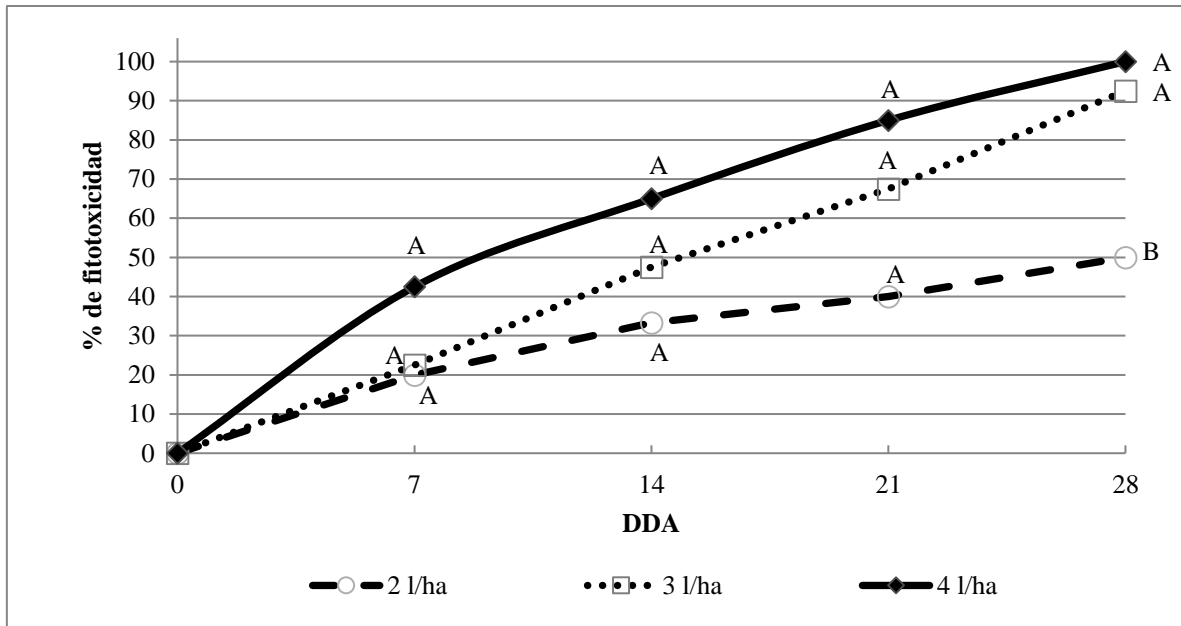


Figura 18. Evolución de la fitotoxidad para los diferentes momentos de evaluación, en las dosis de 2,3 y 4 l ha<sup>-1</sup> de glifosato, para el nivel bajo de azufre. Las comparaciones son sólo validas dentro de cada fecha. Las letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas según el test de Tukey (p<0,05).

En el nivel medio de azufre (Figura 19), fue posible detectar diferencias significativas a los 7 DDA. La dosis de 4 l ha<sup>-1</sup> presentó la mayor fitotoxidad (50%), mientras que la menor dosis superó ligeramente el 20% de fitotoxidad. La dosis de 3 l ha<sup>-1</sup>, evidenció un 30% de fitotoxidad no diferenciándose estadísticamente de los otros tratamientos. A los 21 DDA la mayor dosis presentó un valor elevado de fitotoxidad, cercano al 80%. La menor fitotoxidad fue observada en la dosis de 2 l ha<sup>-1</sup>, con un valor de 45%, mientras que en la dosis de 3 l ha<sup>-1</sup> el valor fue cercano al 60%, no diferenciándose nuevamente de los otros tratamientos. En la última evaluación las mayores dosis (3 y 4 l ha<sup>-1</sup>) superaron el 80% de fitotoxidad, mientras que la dosis inferior solo alcanzó el 70%, no obstante no se registraron diferencias significativas entre las tres dosis en este momento de evaluación.

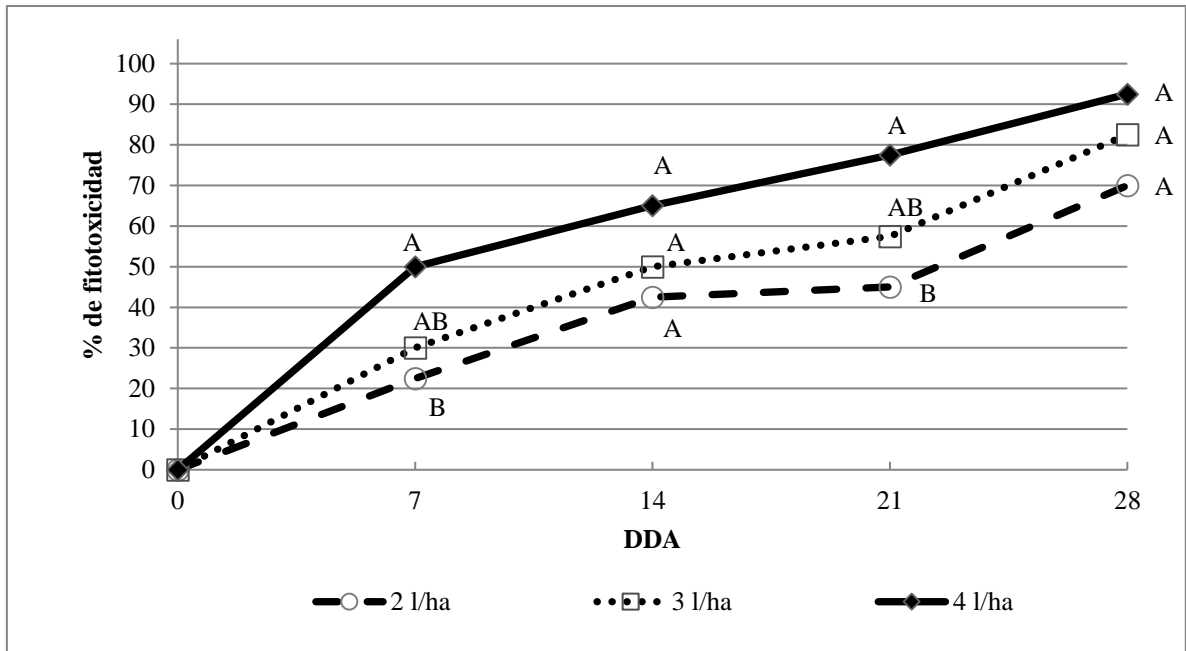


Figura 19. Evolución de la fitotoxidad para los diferentes momentos de evaluación, en las dosis de 2, 3 y 4 l ha<sup>-1</sup> de glifosato, para el nivel medio de azufre. Las comparaciones son sólo validas dentro de cada fecha. Las letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas según el test de Tukey (p<0,05).

En el nivel alto de azufre (Figura 20), nuevamente fue posible detectar diferencias significativas a los 7 DDA entre la menor dosis con una fitotoxidad menor al 20%, y las dosis de 3 y 4 l ha<sup>-1</sup> que superaron el 40%. Los síntomas continuaron evolucionando progresivamente y se superó el 80% de fitotoxidad en las dosis de 3 y 4 l ha<sup>-1</sup> a los 21 DDA. En ese mismo momento de evaluación, la dosis de 2 l ha<sup>-1</sup> solo alcanzó el 50% de fitotoxidad siendo significativamente menor. Al final del ensayo las dosis superiores evidenciaron una fitotoxidad cercana al 100% no diferenciándose entre sí, pero sí de la menor dosis que solo alcanzó el 70%.

A diferencia de lo observado en el ensayo de fósforo donde en la evaluación final no se detectaron diferencias significativas entre los tratamientos, se pudo apreciar que en niveles bajos y altos de azufre, la dosis de 2 l ha<sup>-1</sup> causó una menor fitotoxidad y se diferenció significativamente del resto de los tratamientos.

Teniendo en cuenta la velocidad de manifestación de síntomas, en la mayor dosis utilizada se alcanza una fitotoxicidad de aproximadamente 50% a los 7 DDA en todos los niveles de azufre. La dosis intermedia ( $3 \text{ l ha}^{-1}$ ) requirió 14 DDA para alcanzar esa misma fitotoxicidad en los niveles bajos y medios de azufre, y 7 DDA en el nivel alto. Por último, las diferencias más notables se observaron en la menor dosis evaluada, en donde debieron transcurrir 28, 21 y 14 DDA para alcanzar 50 % de fitotoxicidad en los niveles bajos, medios y altos de azufre respectivamente.

Evidentemente el nivel de azufre en el suelo, tiene una influencia en el control post emergente de esta maleza con glifosato, aunque su efecto es limitado. Con la utilización de dosis reducidas, se observa más claramente la influencia del estado nutricional, en donde la inadecuada disponibilidad de nutrientes puede afectar distintos procesos metabólicos dentro de la planta, y posiblemente reduzca la llegada del herbicida al sitio de acción.

Con respecto a la evaluación del PS, en primer lugar hay que destacar que no se observó un comportamiento diferencial entre los niveles de azufre evaluados (Figura 21), a diferencia de lo registrado en el caso de fósforo (Figura 17).

En ningún nivel de azufre evaluado se registraron diferencias significativas entre las tres dosis de glifosato empleadas, obteniéndose reducciones de la acumulación de PS respecto al testigo en promedio de un 70, 65 y 50% para los niveles de bajos, medios y altos de azufre respectivamente, sin diferencias significativas entre ellos. Esta menor inhibición del crecimiento relativa a medida que aumenta el nivel de azufre, podría estar causada por un mayor crecimiento y acumulación de PS previos a la aplicación del herbicida en los niveles medios y altos de azufre, evidenciando los efectos de retardo de crecimiento por stress nutricional en los niveles bajos.

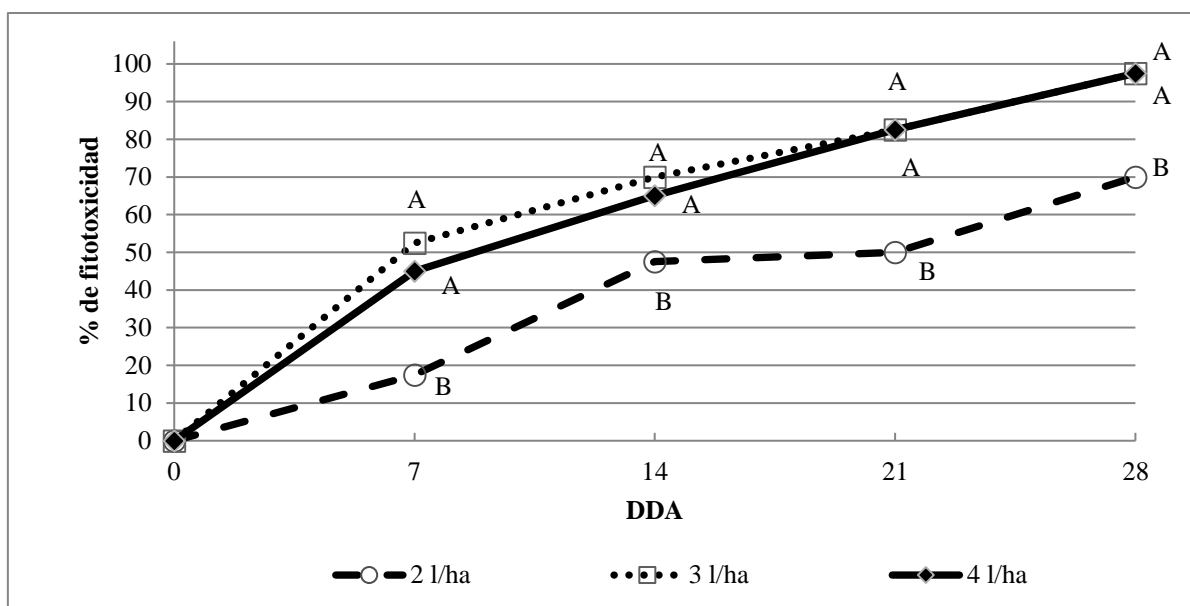


Figura 20. Evolución de la fitotoxicidad para los diferentes momentos de evaluación, en las dosis de 2, 3 y 4 l ha<sup>-1</sup> de glifosato, para el nivel alto de azufre. Las comparaciones son sólo válidas dentro de cada fecha. Las letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas según el test de Tukey ( $p < 0,05$ ).

Como se había mencionado anteriormente, el glifosato es un producto sistémico que se transporta dentro de los vegetales mediante la vía de los fotoasimilados, cualquier factor que limite la absorción o el transporte del producto dentro de la planta, puede hacer disminuir el efecto herbicida en la maleza (Menéndez et al., 1999). Existen algunas publicaciones que mencionan la interacción entre los niveles de fósforo y herbicidas de suelo (Upchurch et al., 1963; Adams y Russell, 1965), pero no fue posible encontrar información sobre la interacción con herbicidas post emergentes.

Las deficiencias de nutrientes minerales pueden afectar el transporte y ciclado de moléculas dentro de la planta (Marschner et al., 1995), lo que se acompaña por cambios en la relación fuente destino entre distintos órganos, funcionando como estrategias adaptativas que permiten modificar la relación tallo/raíz (Mengel y Kirkby, 2000).

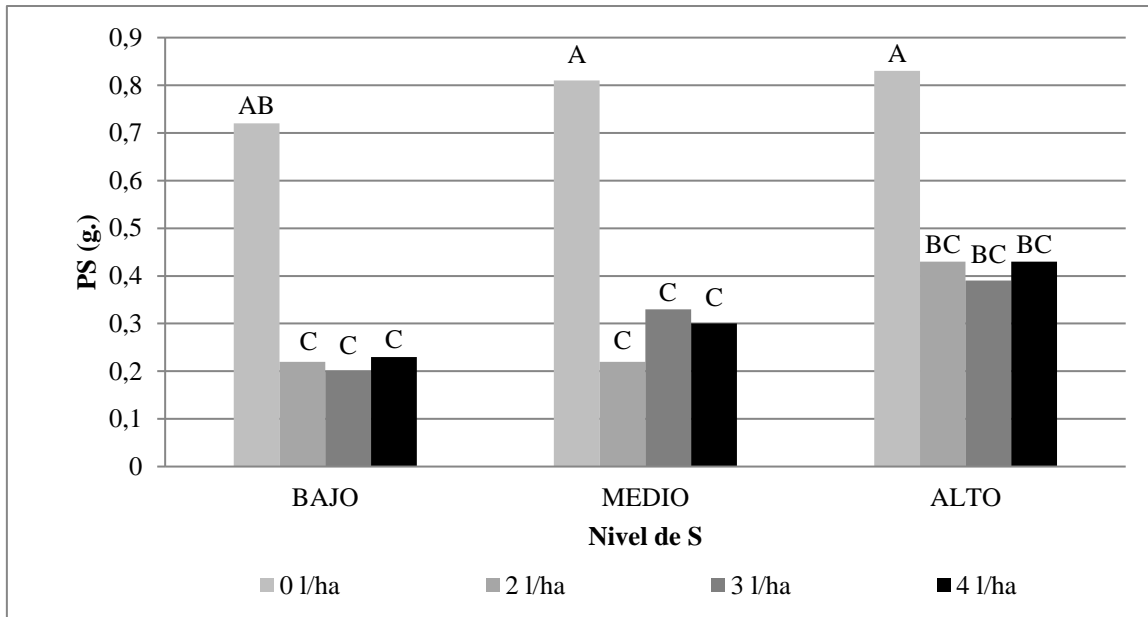


Figura 21. Peso seco registrado a los 28 DDA para los diferentes niveles de azufre, en las dosis de 2, 3 y 4 l ha<sup>-1</sup> de glifosato. Las comparaciones son sólo validas dentro de cada nivel de azufre. Las letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas según el test de Tukey ( $p < 0,05$ ).

Las deficiencias de fósforo específicamente, afectan sensiblemente el transporte de azúcares simples como la sacarosa (Hammond y White, 2008), y también de aminoácidos, en interacción con la disponibilidad de otros nutrientes como nitrógeno (Criado et al., 2017). De igual manera que con el caso del fósforo, las deficiencias de azufre generan cambios metabólicos dentro de la planta, que afectan el transporte de este mismo nutriente (Hawkesford, 2000) y también modifican la absorción y transporte de otros nutrientes (Alhendawi et al., 2005). Al modificarse el transporte por floema bajo estas condiciones, probablemente se verá también afectado el transporte de herbicidas sistémicos aplicados en post emergencia, como glifosato.

En este trabajo se observaron diferencias en el ritmo de manifestación de síntomas de fitotoxicidad por glifosato, entre diferentes niveles de nutrientes evaluados. Si bien en ambos casos (fósforo y azufre) el status nutricional puede afectar la absorción o el transporte de glifosato dentro de la planta, estos efectos parecerían más notables en

deficiencias de azufre, si se considera como parámetro de evaluación la fitotoxicidad. Sin embargo, se necesitan más evaluaciones para consolidar estas afirmaciones.

Por otra parte, si bien existieron diferencias en el ritmo de detección de síntomas, no se registraron diferencias significativas en la fitotoxicidad final entre las dosis de herbicida evaluadas en ningún nivel de fósforo; mientras que en el caso de azufre, la dosis más baja se diferenció estadísticamente del resto en niveles bajos y altos de azufre, alcanzando una menor fitotoxicidad (Figuras 18 y 20). Esto no se pone de manifiesto en las determinaciones de PS (Figura 21).

En este caso, es factible que exista una interacción aún más compleja que en el caso del fósforo. Por un lado, es posible que haya un menor transporte dentro de la planta, debido a la deficiencia nutricional que afecte la llegada del herbicida al sitio de acción, pero además es importante considerar el rol del azufre como parte de los mecanismos de detoxificación de xenobióticos. Además de las reacciones de hidrólisis, la conjugación es una de las principales vías de inactivación de la actividad biológica de herbicidas dentro de la planta. Esta conjugación consiste en la unión del herbicida con diferentes metabolitos y nutrientes de la planta como por ejemplo sacarosa, ácido glucurónico, sulfato, y especialmente glutatión (Hirase y Molin, 2003).

Kuzuhara et al. (2000) evidencian que el déficit de azufre puede modificar los niveles de sulfato dentro de la planta rápidamente, sin embargo los niveles de glutatión permanecen estables en deficiencias limitadas (menores a 10 días). Es posible que en situaciones de stress más prolongados, como en el caso de este estudio, la planta agote sus reservas de glutatión; y en este caso, vería limitada su capacidad de detoxificación de herbicidas.

El resultado del control químico obtenido en diferentes niveles nutricionales de la maleza, implica la interacción del contenido de diferentes nutrientes entre sí, el estado de la maleza, las condiciones de aplicación, las condiciones ambientales de crecimiento y

desarrollo, la molécula herbicida, la maleza en particular, entre otros factores; que dificultan la predicción de una situación real en condiciones de campo. Sin embargo, como criterio general, se evidencia que las plantas de *E. davidii* en buenas condiciones de crecimiento y con adecuada provisión de nutrientes, dentro del rango evaluado, responden mejor a los tratamientos del herbicida glifosato, manifestando más rápidamente los síntomas, y obteniéndose mejores controles; por lo tanto, la deficiencia de nutrientes en distintos suelos de la región podrían explicar en parte los resultados erráticos de control de esta maleza en condiciones de campo, en combinación con otros factores.

## **CAPITULO V**

# **CONSIDERACIONES FINALES**



## **Conclusiones**

A partir de la información generada en los experimentos de campo y laboratorio correspondientes a esta tesis, se ponen a pruebas las hipótesis originalmente planteadas.

En primer lugar, se puede confirmar la existencia de bancos de semillas persistentes de *E. davidii* en los lotes agrícolas evaluados. Se pudo constatar que es una especie con una gran abundancia de semillas en el suelo, a pesar de contar con semillas de tamaño relativamente grande; encontrándose más de 11000 semillas m<sup>-2</sup> en Olavarría y más de 20000 semillas m<sup>-2</sup> en Azul. Respecto a la distribución de las mismas en el perfil del suelo, en lotes bajo siembra directa continua, cerca del 80% de las semillas se encontraban en el estrato superficial (0 a 5 cm), mientras que por efecto de la labranza ese porcentaje se redujo hasta el 50% aproximadamente en lotes con laboreo. La germinación mostró una marcada variabilidad con respecto a localidad, profundidad y momento de muestreo; manifestándose claramente los efectos de dormición de las semillas. La viabilidad no mostró diferencias en ambos momentos de muestreo, siendo superior al 70% en el estrato superficial, y disminuyendo hasta alrededor de un 50% en el estrato más profundo. El efecto de labranza afectó significativamente la viabilidad de los estratos intermedios de semillas (5-10 y 10-15 cm), provocando reducciones de entre 7 y un 12%.

Además durante los períodos evaluados (2011/12 y 2013/14), se constató la emergencia de tres cohortes. Del total de las plántulas emergidas anualmente, más del 80% perteneció a la primera y segunda cohorte. En el primer año de estudio emergieron en total 660 individuos m<sup>-2</sup>, mientras que en el segundo año se detectaron 2400 individuos m<sup>-2</sup>, lo cual podría estar asociado con variaciones en el número y niveles de dormición de semillas en el banco.

En los individuos provenientes de la primera cohorte, se observó una mortalidad inicial significativa (entre etapas de cotiledón y 2-4 hojas), con una reducción de plántulas entre 50 y 80% con respecto a la emergencia inicial registrada. En la segunda cohorte también se observó la ocurrencia de dos eventos significativos de mortalidad; entre las etapas de cotiledón y 2-4 hojas, y entre etapas de 2-4 y 6-8 hojas. La tercera cohorte tuvo un comportamiento variable, diferenciándose entre ambos períodos evaluados. En 2011/12, la aparición tardía de fines de diciembre, dio lugar a individuos que no fueron capaces de producir propágulos, con una mortalidad inicial muy marcada, mientras que cuando dicha cohorte emergió hacia fines de noviembre (segundo período), una buena proporción de las plantas produjeron semillas que se incorporaron al banco.

Los requerimientos de tiempo térmico calculados, fueron en promedio de 192, 370, 515 y 1155 °Cd para las etapas 2-4 H, 6-8 H, ramificación (R) y reproductiva (F), respectivamente. Considerando la escala de tiempo térmico establecida, el mejor momento para el control a campo, se hallaría entre 200 y 500 °Cd, lo que comprende los estados fenológicos de 2-4 hojas a ramificación.

Con respecto a la producción de semillas se registró una producción de 5700, 6400 y 1900 semillas m<sup>-2</sup> para la primera, segunda y tercera cohorte respectivamente. Sin embargo, sumando las tres cohortes, el total de semillas fue similar en ambos períodos (2011/12 y 2013/14) (14.000 semillas m<sup>-2</sup>).

Se destaca el papel de la tercera cohorte de *E. davidii* en los agroecosistemas del centro de la provincia de Buenos Aires, ya que mostró una gran flexibilidad en cuanto al momento de emergencia, siendo capaz de adaptarse a la variabilidad ambiental en comparación con la primera y segunda cohorte. Además, en los lotes de producción es posible que por su densidad y momento de emergencia esta cohorte no sea controlada, teniendo en cuenta que puede estar por debajo del umbral económico, lo que contribuiría

a la reposición del banco de semillas y por lo tanto al aumento de los niveles de infestación.

Con respecto a la segunda hipótesis, referida a la existencia de biotipos con diferente sensibilidad a glifosato, en el bioensayo con semillas la población de Espartillar resultó ser la más sensible, hallándose un valor de concentración efectiva media ( $CE_{50}$ ) de 4 g e.a.  $l^{-1}$ . Los índices de resistencia (IR) obtenidos comparando la  $CE_{50}$  de las localidades de Azul, Olavarría y Barrow respecto de la  $CE_{50}$  de la población sensible (Espartillar) fueron: 1,76; 2,39 y 2,48 respectivamente. En comparación a otros casos de resistencia a glifosato en otras especies, los valores de IR obtenidos son relativamente bajos (<5).

En los ensayos donde se determinó shikimato, se destaca que en la población de Espartillar la concentración de este metabolito en plantas tratadas con glifosato resultó ser el doble o triple de acuerdo a la dosis utilizada, mientras que en las poblaciones de Azul, Olavarría y Barrow, no se detectaron diferencias significativas para ninguno de los tratamientos con glifosato.

En el sentido estricto de cómo fue planteada la hipótesis 2, debe ser rechazada, ya los fundamentos hallados aquí no son suficientes como para afirmar la existencia de biotipos de *E. davidii* con resistencia al glifosato. Sin embargo, en función de los resultados aquí presentados que demuestran diferencias en la sensibilidad de los biotipos, se alerta sobre el riesgo de evolución hacia la resistencia en la región, dado que *E. davidii* es una maleza invasora que tiene poca historia de existencia en la zona centro de la provincia de Buenos Aires.

Con respecto a la tercera hipótesis de este trabajo se puede afirmar que se observaron diferencias en la acción del herbicida glifosato, entre diferentes niveles de nutrientes evaluados (P y S). En primer lugar, hay que mencionar que no se registraron diferencias significativas en la fitotoxicidad final entre las dosis de herbicida evaluadas en ningún

nivel de fósforo; mientras que en el caso de azufre, la dosis más baja se diferenció estadísticamente del resto en niveles bajos y altos de azufre, alcanzando una menor fitotoxicidad.

Si bien la fitotoxicidad resultó similar en todos los niveles de fósforo evaluados, es posible observar una diferencia en la velocidad de presentación de los síntomas. En el nivel bajo de fósforo todas las dosis evaluadas necesitaron al menos 14 días para alcanzar un 50% de fitotoxicidad; mientras que en los niveles medios y altos de fósforo, la dosis más alta alcanzó un valor cercano al 50% de fitotoxicidad a los 7 DDA y las dosis de 2 y 3 l ha<sup>-1</sup> necesitaron un mínimo de 14 días para alcanzar ese mismo nivel de fitotoxicidad.

Por su parte, en el caso del ensayo de azufre, con la mayor dosis (4 l ha<sup>-1</sup>) utilizada se alcanzó una fitotoxicidad de aproximadamente 50% a los 7 DDA en todos los niveles de azufre. La dosis intermedia (3 l ha<sup>-1</sup>) requirió 14 DDA para alcanzar esa misma fitotoxicidad en los niveles bajos y medios de azufre, y 7 DDA en el nivel alto. Por último, las diferencias más notables se observaron en la menor dosis evaluada, en donde debieron transcurrir 28, 21 y 14 DDA para alcanzar 50 % de fitotoxicidad en los niveles bajos, medios y altos de azufre respectivamente.

Diferentes factores influyen en la actividad de un herbicida post emergente como diferentes niveles nutricionales y estado fenológico de la maleza, las condiciones ambientales de aplicación, las condiciones de crecimiento y desarrollo, la molécula herbicida, la especie de maleza en particular, entre otros factores. Lo antes mencionado dificulta la comprensión de un resultado obtenido en condiciones de campo; sin embargo en base a los resultados de los presentes trabajos respecto a *E. davidii* se puede afirmar que bajo buenas condiciones de crecimiento y con adecuada provisión de nutrientes, dentro del rango evaluado, se obtienen mejores respuestas a los tratamientos con el herbicida glifosato, manifestando más rápidamente los síntomas, y obteniéndose mejores

controles; por lo tanto, la deficiencia de nutrientes en distintos suelos de la región podría explicar en parte los resultados erráticos de control de esta maleza en condiciones de campo, en combinación con otros factores.

Se espera que la información aportada en la totalidad de los ensayos presentados, contribuya a un mayor conocimiento del comportamiento ecofisiológico de *E. davidii*, y facilite en la correcta toma de decisiones tendientes a un manejo integrado de esta maleza, con un menor impacto ambiental.

**Literatura citada**

ABDELGALEIL, S.; EL-ASWAD, A.; NAKATANI, M. 2002. Molluscicidal and anti-feedant activities of diterpenes from *Euphorbia paralias* L. **Pest Management Science**, v.58, n.5, p. 479-482. DOI: 10.1002/ps.487.

ADAMS, J.R.; RUSSELL, S. 1965. Phosphorus fertilization and the phytotoxicity of simazine. **Weeds**, n.2, p.113-116. DOI: 10.2307/4041150.

ADELUSI, A.P.; ODUFEKO, G.T.; MAKINDE, A.M. 2006. Interference of *Euphorbia heterophylla* L. on the growth and reproductive yield of soybean (*Glycine max* (Linn.) Merrill. **Res. J. Bot**, v. 1, n. 2, p. 85-94.  
<http://docsdrive.com/pdfs/academicjournals/rjb/2006/85-94.pdf>

AITKEN, Y. 1974. Flowering time, climate and genotype: the adaptation of agricultural species to climate through flowering responses. Melbourne University Press. Melbourne, Australia, p. 193. ISBN: 052284071X.

ALHENDAWI, R.A.; KIRKBY, E.A.; PILBEAM, D.J.2005.Evidence that sulfur deficiency enhances molybdenum transport in xylem sap of tomato plants. **Journal of plant nutrition**, v. 28, n. 8, p. 1347-1353. DOI: <http://dx.doi.org/10.1081/PLN-200067449>.

AMÂNCIO, S.; TAVARES, S.; FERNÁNDEZ, J.; SOUSA, C. 2009. Grapevine & Sulfur: Old Partners, New Achievements. Capítulo 2. En: **Grapevine Molecular Physiology & Biotechnology**. A. R. Kalliopi (ed). Segunda edición. Springer. Greece. p. 31-52. DOI: [https://doi.org/10.1007/978-90-481-2305-6\\_2](https://doi.org/10.1007/978-90-481-2305-6_2).

AMBROSIO, L.; IGLESIAS, L.; MARÍN, C.; DEL MONTE, J.P. 2004.Evaluation of sampling methods and assessment of the simple size to estimate the weed seedbank in

soil, taking into account spatial variability. **Weed Research**, v. 44, n.3, p. 224-236. DOI: 10.1111/j.1365-3180.2004.00394.x.

AMRHEIN, N.; DEUS, B.; GEHRKE, P.; STEINRÜCKEN, H.C. 1980. The site of the inhibition of the shikimate pathway by glyphosate. II. Interference of glyphosate with chorismate formation in vivo and in vitro. **Plant Physiology**, v. 66, n.5, p.830 – 834. DOI:

10.1104/pp.66.5.830. ANDERSON, K.A.; COBB, W.T.; LOPER, B. R. 2001. Analytical method for determination of shikimic acid: shikimic acid proportional to glyphosate application rates. **Communications in Soil Science and Plant Analysis**, v.32, n.17-18, p. 2831 – 2840. DOI: 10.1081/CSS-120000965.

ANNAPURNA, J.; CHOWDARY, I.P.; LALITHA, G.; RAMAKRISHNA, S.V.; IYENGAR, D.S. 2004. Antimicrobial activity of *Euphorbia nivulia* leaf extract. **Pharmaceutical Biology**, v. 42, n.2, p.91-93. DOI: dx.doi.org/10.1080/13880200490510658.

BACIGALUPO, N.M. *Euphorbiaceae*, 2005. En: BURKART, A. Y BACIGALUPO, N.M. (eds.). Flora Ilustrada de Entre Ríos, **Colección Científica del INTA**, Tomo VI (parte IV, B) p. 101-195.

BAKER, H.G. 1989. Some aspects of the natural history of seed banks. En: LECK, M.A.; PARKER, V.T.; SIMPSON, R.L. (Ed.) **Ecology of soil seed banks**. London: Academic Press, cap.1, p.5-19.

BALLARÉ, C. L.; SCOPEL, L.; GHERSA, C.M.; SANCHEZ, R.A. 1988. The fate of *Datura ferox* L. seeds in the soil as affected by cultivation depth of burial and degree of maturity. **Annals of applied biology**, v. 112, n. 2, p. 337-345. DOI: 10.1111/j.1744-7348.1988.tb02070.x.

- BANNON, J.S.; BAKER, J.B.; ROGERS, R.L. 1976 .Interactions of temperature and light in breaking of seed dormancy of *Euphorbia heterophylla* L. **Plant Physiology**, v. 57, n. 5, p. 25-25.
- BARINA, Z.; SHEVERA, M.; SÎRBU, C.; PINKE, G. 2013. Current distribution and spreading of *Euphorbia davidii* (*E. dentata* agg.) in Europe. **Central European Journal of Biology**, v.8, n.1, p. 87- 95. DOI: <https://doi.org/10.2478/s11535-012-0111-7>.
- BARRALIS, G.; CHADOEUF, R.; LONCHAMP, J. P.1988.Longevity of annual weed seeds in a cultivated soil. **Weed Research**, v. 28, n. 6, p. 407-418. DOI: 10.1111/j.1365-3180.1988.tb00821.x.
- BEATTIE, A.J.; LYONS, N. 1975. Seed dispersal in *Viola* (Violaceae): adaptations and strategies. **American Journal of Botany**, v. 62, n. 7, p. 714-722. <http://www.jstor.org/stable/2442060>.
- BEDOYA, L.M.; MARQUEZ, N.; MARTINEZ, N.; GUTIERREZ-EISMAN, S.; ALVAREZ, A.; CALZADO, M.A.; ROJAS, J.M.; APPENDINO, G.; MUNOZ, E.; ALCAMI, J. 2009. SJ23B, a jatrophone diterpene activates classical PKCs and displays strong activity against HIV in vitro. **Biochemical Pharmacology**, v.77, n. 6, p. 965-978. DOI: [doi.org/10.1016/j.bcp.2008.11.025](https://doi.org/10.1016/j.bcp.2008.11.025).
- BEGON, M.; HARPER, J.L.; TOWNSEND, C.R. 1988. **Ecología: individuos, poblaciones y comunidades**. Ed. Omega S.A. v. 1, p. 883.
- BEGON, M.; TOWNSEND, C.R.; HARPER, J.L. 2006. **Ecology: From Individuals to Ecosystems**, 4th Edition. Wiley-Blackwell, Oxford. 752 p. ISBN: 978-1-4051-1117-1.
- BENBROOK, C.M. 2016. Trends in glyphosate herbicide use in the United States and globally. **Environmental Sciences Europe**, v. 28, n. 1, p. 3.
- BENECH-ARNOLD, R. L.; GHERSA, C. M.; SANCHEZ, R. A.; FERNANDEZ, A. G. 1988. The role of fluctuating temperatures in the germination and establishment of



*Sorghum halepense* (L.) Pers. Regulation of germination under leaf canopies. **Functional Ecology**, v.2, n.3, p. 311-318. DOI: 10.2307/2389403.

BENECH-ARNOLD, R. L.; SÁNCHEZ, R. A.; FORCELLA, F.; KRUK, B. C.; GHERSA, C. M. 2000. Environmental control of dormancy in weed seed banks in soil. **Field Crops Research**, v. 67, n. 2, p. 105-122. DOI: doi.org/10.1016/S0378-4290(00)00087-3.

BENOIT, D.L.; KENEL, N.C.; CAVERS, P.B.1989.Factors influencing the precision of soil seed bank estimates. **Canadian Journal of Botany**, v.67, n.10, p.2833-2840. DOI: <https://doi.org/10.1139/b89-364>.

BLOCKSTEIN, D.; MAXWELL, B. D.; FAY, P. K. 1987. Dispersal of leafy spurge seeds (*Euphorbia esula*) by mourning doves (*Zenaidura macroura*). **Weed Science**, v. 35, n. 2, p. 160-162. <http://www.jstor.org/stable/4044383>.

BOOTH, B.D.; MURPHY, S.D.; SWANTON, C.J. 2003.**Weed ecology in natural and agricultural systems**. CABI publishing. Londres, Reino Unido. 303 p., DOI: 10.1079/9780851995281.0000.

BORZA, J.K.; WESTERMAN, P.R.; 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**, v.21, n.2, p. 518-522. DOI: doi.org/10.1614/WT-06-110.

BREW, C.R.; O`DOWD, D.J.; RAE, I.D. 1989.Seed dispersal by ants: behaviour-releasing compounds in elaiosomes. **Oecologia**, v.80, n.4, p. 490-497. DOI: 10.1007/BF00380071.

BRIDGES, D.C.; BRECKE, B.J.; BARBOUR, J.C. 1992. Wild poinsettia (*Euphorbia heterophylla*) interference with peanut (*Arachis hypogaea*). **Weed Science**, v.40, n.1, p. 37-42. <http://www.jstor.org/stable/4045149>.

BRIEN HENRY, W.; SHANER, D.L.; WEST, M.S. 2007. Shikimate accumulation in sunflower, wheat and proso millet after glyphosate application. **Weed Science**, v. 55, n. 1, p. 1 – 5. DOI: 10.1614/WS-06-065.1.

BUCHNER, P.; STUIVER, C.E.E.; WESTERMAN, S.; WIRTZ, M.; HELL, R.; HAWKESFORD, M.J.; DE KOK, L.J. 2004. Regulation of sulfate uptake and expression of sulfate transporter genes in *Brassica oleracea* as affected by atmospheric H<sub>2</sub>S and pedospheric sulfate nutrition. **Plant Physiology**, v. 136, n.2, p. 3396–3408. DOI: doi.org/10.1104/pp.104.046441.

CAPPELLO, V.; FORTUNATO, N. 2013. **Plaguicidas en el territorio bonaerense: información toxicológica, ecotoxicológica y comportamiento ambiental**. Dirección Provincial de Recursos Naturales. Programa Gestión Ambiental en Agroecosistemas. Buenos Aires. v. 1, p. 1-136.

CARMONA, R. 1992. Problemática e manejo de bancos de sementes de invasoras em solos agrícolas. **Planta Daninha**, v. 10, n. 1-2, p. 5-16. DOI: dx.doi.org/10.1590/S0100-83581992000100007.

CARTER, M. R.; IVANY, J. A. 2006. Weed seed bank composition under three long-term tillage regimes on a fine sandy loam in Atlantic Canada. **Soil and Tillage Research**, v. 90, n. 1-2, p. 29-38. DOI: doi.org/10.1016/j.still.2005.08.002.

CARVALHO, N. M.; NAKAGAWA, J. 2000. **Sementes: ciência, tecnologia e produção**. Jaboticabal: Ed. FUNEP. 588p. ISBN: 85-87632-01-9.

CAVERS, P. B.; BENOIT, D. L. 1989. Seed banks in arable land. En: LECK, M. A; PARKER, V. T.; SIMPSON, R. L. **Ecology of soil seed banks**. San Diego: Academic Press, p. 309-328.

CHRISTOFFOLETI, P.J. 2004. **Aspectos de resistência de plantas daninhas a herbicidas**. Campinas: HRAC-BR, 100 p.

- CIVIDANES, F.J. 2002. Tabelas de vida de fertilidade de *Brevicoryne brassicae* (L.) (Hemiptera: Aphididae) em condições de campo. **Neotropical Entomology**, v. 31, n.3, p. 419-427. <http://www.scielo.br/pdf/ne/v31n3/a11v31n3>.
- CLARK, S.J., PERRY, J.N.; MARSHALL J.P.1996. Estimating Taylor's power law parameters for weeds and the effect of spatial scale. **Weed Research**, v. 36, n. 5, p. 405-417. DOI: 10.1111/j.1365-3180.1996.tb01670.x.
- CLEMENTS, D. R.; BENOTT, D. L.; MURPHY, S. D.; SWANTON, C. J. 1996. Tillage effect on weed seed return and seedbank composition. **Weed Science**, v. 44, n. 2, p. 314-322. <http://www.jstor.org/stable/4045684>.
- COOK, E.R.; KAIRIUKSTIS, L.A. 2013 .**Methods of dendrochronology: applications in the environmental sciences**. Springer Science & Business Media, 393 p.
- CORDES, J.C.; JOHNSON, W.G.; SCHARF, P.; SMEDA, R.J. 2004.Late-emerging common waterhemp (*Amaranthus rudis*) interference in conventional tillage corn. **Weed Technology**, v. 18, n. 4, p. 999-1005. DOI: [doi.org/10.1614/WT-03-185R](https://doi.org/10.1614/WT-03-185R).
- COUSENS, R. 1987.Theory and reality of weed control thresholds. **Plant Protection Quarterly**, v. 2, n. 1, p. 13-20.
- COUTINHO, D.J.G.; BARBOSA, M.O.; DE SOUZA, R.J.C.; DA SILVA, A.S.; DA SILVA, S.I.; DE OLIVEIRA, A.F.M. 2016. Biodiesel potential of the seed oils from some Brazilian native *Euphorbiaceae* species. **Renewable Energy**, v.91, p.275-281. DOI: [doi.org/10.1016/j.renene.2016.01.064](https://doi.org/10.1016/j.renene.2016.01.064).
- CRIADO, M.V.; VELIZ, C.G.; ROBERTS, I.N.; CAPUTO, C. 2017. Phloem transport of amino acids is differentially altered by phosphorus deficiency according to the nitrogen availability in young barley plants. **Plant Growth Regulation**, v. 82, n. 1, p. 151-160. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10725-017-0247-6>.

- DALAI, R.C. 1977. Soil organic phosphorus. **Advances in agronomy**, v. 29, p. 83-117.
- Visto en MENGEL, K.; KIRKBY, E. A. 2000, Principios de Nutrición vegetal. 4ta. Edición, 1ra. en español. Instituto Internacional del Potasio, Basilea, Suiza, 535 p.
- DAWSON, G. 1965. *Euphorbiaceae*. En; CABRERA, A. (ed.). **Flora de la Provincia de Buenos Aires**, Tomo IV, parte 4a. Colección Científica del INTA.
- DEEVEY, E.S. 1947. Life tables for natural populations of animals. **The Quarterly Review of Biology**, v. 22, n. 4, p. 283-314. DOI: <https://doi.org/10.1086/395888>.
- DEMIRKIRAN, Ö.; TOPÇU, G.; HUSSAIN, J.; AHMAD, V.U.; CHOUDHARY, M.I. 2011. Structure elucidation of two new unusual monoterpene glycosides from *Euphorbia decipiens*, by 1D and 2D NMR experiments, **Magnetic Resonance in Chemistry**, v.49, n. 10, p. 673-677. DOI: 10.1002/mrc.2795.
- DESSAINT, F.; BARRALIS, G.; CAIXINHAS, M. L.; MAYOR, J. P.; RECASENS, J.; ZANIN, G. 1996. Precision of soil seedbank sampling: how many soil cores? **Weed Research**, v. 36, n. 2, p. 143-151. DOI: 10.1111/j.1365-3180.1996.tb01810.x.
- DEVI, L.S.; GUPTA, P. 2000. Evaluation of some plant latices against *Heterodera cajani* on cowpea (*Vigna sinensis*). **National Academy Science Letters**, v.23, n. 5-6, p.65-67.
- DICKSON, R. L.; ANDREWS, M.; FIELD R. J.; DICKSON E.L. 1990. Effect of water stress, nitrogen, and gibberellic acid on fluazifop and glyphosate activity on oats (*Avena sativa*). **Weed Science**, n. 38, n. 1, p. 54-61. DOI: <https://doi.org/10.1017/S0043174500056113>.
- DOĞRAMACI, M.; FOLEY, M.E.; HORVATH, D.P.; HERNANDEZ, A.G.; KHETANI, R.S.; FIELDS, C.J.; KEATING, K.M.; MIKEL, M.M.; ANDERSON, J.V. 2015. Glyphosate's impact on vegetative growth in Leafy spurge identifies molecular processes and Hormone cross-talk associated with increased branching. **BMC Genomics**, v.16, n. 1, p. 395. DOI: 10.1186/s12864-015-1627-9.

DOS SANTOS, A.F.; DE AZEVEDO, D.P.L.; DOS SANTOS MATA, R.; DINIS DE MENDONCA, D.; GOULART SANT'ANA, A.E. 2007. The lethality of *Euphorbia conspicua* to adults of *Biomphalaria glabrata*, cercaria of *Schistosoma mansoni* and larvae of *Artemia salina*. **Bioresource Technology**, v.98, n. 1, p. 135-139. DOI: doi.org/10.1016/j.biortech.2005.11.020.

DOWNTOWN, W.J.S. 1971. Adaptive and evolutionary aspects of C4 photosynthesis. En: HATCH, M.D.; OSMOND, C.B.; SLATYER, R.O. **Photosynthesis and photorespiration**. New York, (Ed.). John Wiley & Sons.

DOWNTOWN, W.J.S. 1975. Occurrence of C4 photosynthesis among plants. **Photosynthetica**, v. 9, n. 1, p. 96-105.

DUKE, S.O. 1988. Glyphosate, En Herbicides: **Chemistry, Degradation, and Mode of Action**, v. 3, Ed. by Kearney, P.C.; Kaufman, D.D.; Dekker, M. New York, p. 1–70.

DUKE, S. O. 2018. The history and current status of glyphosate. **Pest management science**, v. 74, n. 5, p. 1027-1034.

DUKE, S.O.; HOAGLAND, R.E. 1978. Effects of glyphosate on metabolism of phenolic compounds. I. Induction of phenylalanine ammonia-lyase activity in darkgrown maize roots. **Plant Science Letters**, v. 11, n. 3 - 4, p. 185-190. DOI:10.1016/0304-4211(78)90002-0.

EAGER, E. A.; HARIDAS, C. V.; PILSON, D.; REBARBER, R.; TENHUMBERG, B. 2013. Disturbance frequency and vertical distribution of seeds affect long-term population dynamics: A mechanistic seed bank model. **The American Naturalist**, v. 182, n. 2, p. 180-190. DOI: doi.org/10.1086/670987.

EGUNJOBI, J. K.; KUPOLUYI, A.O. 1973. Studies on Nigerian weeds. 1. Biology and control of *Euphorbia heterophylla* L. En **Proceedings of the third Nigerian Weed Science group meeting**. Samaru (Nigeria), Institute of Agricultural Research, p. 42-46.

EIRA, M. T. S.; MARTINS NETTO, D. A. M.; RIBEIRO, J. 1998. Germinação e conservação de sementes de espécies lenhosas. Cerrado: matas de galeria. Planaltina: **EMBRAPA – CPAC**, p. 97-117.

EKELEME, F.; CHIKOYE, D.; AKOBUNDU, I.O. 2005. Weed seedbank response to planted fallow and tillage in southwest Nigeria. **Agroforestry Systems**, v. 63, n. 3, p. 299-306. DOI: 10.1007/s10457-005-5747-0.

EL-BASSUONY, A.A. 2007. Antibacterial activity of new polyester diterpenes from *Euphorbia guyoniana*. *Asian Journal of Chemistry*, v.19, n. 6, p. 4553-4562. [http://www.asianjournalofchemistry.co.in/User/ViewFreeArticle.aspx?ArticleID=19\\_6\\_60](http://www.asianjournalofchemistry.co.in/User/ViewFreeArticle.aspx?ArticleID=19_6_60).

ESPADALER, X.; GÓMEZ, C. 1996. Seed production, predation and dispersal in the Mediterranean myrmecochore *Euphorbia characias* (Euphorbiaceae). **Ecography**, v. 19, n.1, p. 7-15. DOI: 10.1111/j.1600-0587.1996.tb00150.x.

ESPADALER, X.; GÓMEZ, C. 1997. Soil surface scanning and transport of *Euphorbia characias* seeds by ants. **Acta Oecologica**, v. 18, n. 1, p. 39-46. DOI: [https://doi.org/10.1016/S1146-609X\(97\)80079-3](https://doi.org/10.1016/S1146-609X(97)80079-3).

FAGERIA, N. K. 2009. Sulfur. Capítulo 7. p. 448. En: **The use of nutrient in crop plants**. CRC press.

FAHN, A. 1985. **Anatomía Vegetal**. 3º Edición. Ediciones Pirámide, S.A. Madrid, 569 p.

FALODUN, A.; ALI S.; QUADIR, I.M.; CHOUDHARY, I.M.I. 2008. Phytochemical and biological investigation of chloroform and ethylacetate fractions of *Euphorbia heterophylla* leaf (Euphorbiaceae). **Journal of Medicinal Plants Research**, v. 2, n. 12, p.365-369. <http://www.academicjournals.org/journal/JMPR/article-full-text-pdf/A8F79DA15657>.

FAZLE RABBI, A.M. 2013. Imbalance in Life Table: Effect of infant mortality on lower life expectancy at birth. **Journal of Scientific Research**, v. 5, n. 3, p. 479-488. DOI: [dx.doi.org/10.3329/jsr.v5i3.14105](https://doi.org/10.3329/jsr.v5i3.14105).

FENNER, M. 1991. The effects of the parent environment on seed germinability. **Seed Science Research**, v.1, n. 2, p. 75-84. DOI: [doi.org/10.1017/S0960258500000696](https://doi.org/10.1017/S0960258500000696).

FERNÁNDEZ-QUINTANILLA, C. 1988. Studying the population dynamics of weeds. **Weed Research**, v. 25, n. 6, p. 443-447. DOI: [10.1111/j.1365-3180.1988.tb00826.x](https://doi.org/10.1111/j.1365-3180.1988.tb00826.x).

FOKIALAKIS, N.; MELLIYOU, E.; MAGIATIS, P.; HARVALA, C.; MITAKU, S. 2003. Composition of the steam volatiles of six *Euphorbia* spp. from Greece, **Flavour and fragrance journal**, v.18, n. 1, p. 39-42. DOI: [10.1002/ffj.1148](https://doi.org/10.1002/ffj.1148).

FORCELLA, F. 1998. Real-time assessment of seed dormancy and seedling growth for weed management. **Seed Science Research**, v. 8, n. 2, p. 201-210. DOI: <https://doi.org/10.1017/S0960258500004116>.

FORCELLA, F.; WEBSTER, T.; CARDINA, J. 2004. Protocolos para la determinación de bancos de semillas de malezas en los agrosistemas. En Labrada, R. Ed. **Manejo de malezas para países en desarrollo**. Addendum 1. FAO. Roma, Italia.

FRENEY, J. R.; STEVENSON, F. J. 1966. Organic sulfur transformations in soils. **Soil science**, v. 101, n. 4, p. 307-316. Visto en MENGEL, K.; KIRKBY, E. A. Principios de Nutrición vegetal. 4<sup>ta</sup> Edición, 1<sup>o</sup> en español. Instituto Internacional del Potasio, Basilea, Suiza, 2000, 535 p.

GADGIL, M.; SOLBRIG, O. 1972. The concept of r and K selection: evidence from wildflowers and some theoretical considerations. **The American Naturalist**, v. 106, n. 947, p. 14-31. DOI: [doi.org/10.1086/282748](https://doi.org/10.1086/282748).

GADIOLI, J.L.; DOURADO-NETO, D.; GARCIA, Y.; GARCIA, A.; DEL VALLE BASANTA, M. 2000. Temperatura do ar, rendimento de grãos de milho e caracterização

fenológica associada à soma calórica. **Scientia Agricola**, v. 57, n. 3, p. 377-383.  
<http://www.scielo.br/pdf/sa/v57n3/2663.pdf>.

GAITONDE, M.K.; GORDON, M.W. 1958. A microchemical method for the detection and determination of shikimic acid. **Journal of Biological Chemistry**, v. 230, n. 2, p. 1043 -1050. <http://www.jbc.org/content/230/2/1043.short>.

GALASSO, G.; VERLOOVE, F.; ZANETTA, A.G.; POLDINI, L. 2011. Notulae: 70-71, 73. En: Notulae alla checklist della flora vascolare italiana: 11(1751-1822), **Informatore Botanico Italiano**, v. 43, n. 1, p.147.

GELTMAN, D.V. 2012. American species *Euphorbia davidii* Subils (Euphorbiaceae) in the flora of East Europe and the Caucasus. **Turczaninowia**, v. 15, n. 1, p. 37 – 39.

GHERSA, C. M.; MARTINEZ-GHERSA, M. A. 2000. Ecological correlates of weed seed size and persistence in the soil under different tilling systems: implications for weed management. **Field Crops Research**, v. 67, n. 2, p. 141-148. DOI: [doi.org/10.1016/S0378-4290\(00\)00089-7](https://doi.org/10.1016/S0378-4290(00)00089-7).

GIROD, C.H.R.; FRIED, G.; 2011, *Euphorbia davidii* Subils, an agricultural emerging invader in France. 3<sup>rd</sup> International Symposium on Environmental Weeds and Invasive Plants. Abstracts, **Swiss Federal Institute for Forest, Snow and Landscape Research WSL**, p. 59.

GÓMEZ, C.; ESPADALER, X. 1994. Curva de dispersión de semillas por hormigas en *Euphorbia characias* L. y *Euphorbia nicaeensis* All. (Euphorbiaceae). **Ecología Mediterránea**, v. 20, n. 3-4, p. 51-59.

GONZALEZ, S.; GHERMANDI, L. 2012. Comparison of methods to estimate soil seed banks: the role of seed size and mass. **Community Ecology**, v. 13, n. 2, p. 238-242.



- GONZÁLEZ-ANDÚJAR, J.L.; FERNÁNDEZ-QUINTANILLA, C. 1991. Modeling the population dynamics of *Avena sterilis* under dry land cereal cropping systems. **Journal of Applied Ecology**, v. 28, n. 1, p. 16-27. DOI: 10.2307/2404110.
- GOVAERTS, R.; FRODÍN, D.G.; RADCLIFFE-SMITH, A. 2000. World checklist and bibliography of *Euphorbiaceae*. **Royal Botanic Gardens, Kew**, v. 1-4, p. 1-1620.
- LOPEZ GRANADOS, F.; GARCIA TORRES, L. 1993. Seed bank and other demographic parameters of broomrape (*Orobanche crenata* Forsk) populations in faba bean (*Vicia faba* L.). **Weed Research**, v. 33, n. 4, p. 319-327. DOI: 10.1111/j.1365-3180.1993.tb01947.x.
- HALAWEISH, F.T; KRONBERG, S.; HUBERT, M.B.; RICE, J.A. 2002. Toxic and aversive diterpenes of *Euphorbia esula*. **Journal of Chemical Ecology**, v.28, n.8, p. 1599-1611. DOI: <https://doi.org/10.1023/A:1019976413040>.
- HAMMOND, J.P.; WHITE, P.J. 2008. Sucrose transport in the phloem: integrating root responses to phosphorus starvation. **Journal of experimental botany**, v. 59, n. 1, p. 93-109. DOI: <https://doi.org/10.1093/jxb/erm221>.
- HARPER, J.L. 1957. The ecological significance of dormancy and its importance in weed control. En Proceedings of the **4<sup>th</sup> International Congress of Crop Protection**, v.1, p. 415-420.
- HARRING, T.; STREIBIG, J.C.; HUSTED, S. 1998. Accumulation of shikimic acid: a technique for screening glyphosate efficacy. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 46, n. 10, p. 4406 – 4412. DOI: 10.1021/jf9802124.
- HARTZLER, R. G. 1996. Velvetleaf (*Abutilon theophrasti*) population dynamics following a single year's seed rain. **Weed Technology**, v. 10, n. 3, p. 581-586. <http://www.jstor.org/stable/3988158>.

HARTZLER, R.G.; BATTELS, B.A.; NORDBY, D. 2004. Effect of common waterhemp emergence date on growth and fecundity in soybean. **Weed Science**, v. 52, n. 2, p. 242-245. DOI: doi.org/10.1614/WS-03-004R.

HAWKESFORD, M.J. 2000. Plant responses to sulphur deficiency and the genetic manipulation of sulphate transporters to improve S-utilization efficiency. **Journal of Experimental Botany**, v. 51, n. 342, p. 131-138. DOI: <https://doi.org/10.1093/jexbot/51.342.131>.

HEAP, I. 2016. The **International Survey of Herbicide Resistant Weeds**. Online. Internet. Saturday, June 4, 2016. Available [www.weedscience.org](http://www.weedscience.org).

HEAP, I.; DUKE, S.O. 2018. Overview of glyphosate-resistant weeds worldwide. **Pest management science**, v.74, n. 5, p. 1040-1049.

HIRASE, K.; MOLIN, W.T. 2003. Sulfur assimilation in plants and weed control: Potential targets for novel herbicides and action sites of certain safeners. **Weed Biology and Management**, v. 3, n. 3, 147-157. DOI: 10.1046/j.1445-6664.2003.00098.x.

HOFFER-MASSARD, F. 2011. *Euphorbia davidii* Subils, une nouvelle espèce pour la Suisse?, **Bulletin du Cercle vaudois de botanique**, v. 40, p. 93-94. <http://doc.rero.ch/record/28706>.

HOLT, J. 2004. Principles of weed management in agroecosystems and wildlands. **Weed Technology**, v. 18, p. 1559-1562. DOI: doi.org/10.1614/0890-037X(2004)018[1559:POWMIA]2.0.CO;2.

INSTITUTO DE BOTÁNICA DARWINION (on line). 2014. Flora del Conosur. Catálogo de Plantas Vasculares. Disponible en: <http://www2.darwin.edu.ar/Proyectos/FloraArgentina/Generos.asp?genus=Euphorbia> [accessed 2014/12/09].

ISTA. 2011. International Rules for Seed Testing. Bassersdorf, Switzerland: **International Seed Testing Association**. [https://www.seedtest.org/en/international-rules-\\_content---1--1083.html](https://www.seedtest.org/en/international-rules-_content---1--1083.html).

JACKSON, P.C.; HAGEN, C.E. 1960. Products of orthophosphate absorption by barley roots. *Plant physiology*, v. 35, n. 3, p. 326-332. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC405966/pdf/plntphys00472-0042.pdf>

JASSBI, A.R. 2006. Chemistry and biological activity of secondary metabolites in *Euphorbia* from Iran, **Phytochemistry**, v. 67, n. 18, p. 1977-1984. DOI: [doi.org/10.1016/j.phytochem.2006.06.030](https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2006.06.030).

JEPSON FLORA. 2014. **Jepson Herbarium** (on line). Universidad de California Berkeley. Disponible en: [http://ucjeps.berkeley.edu/cgi-bin/get\\_IJM.pl?tid=25540](http://ucjeps.berkeley.edu/cgi-bin/get_IJM.pl?tid=25540) [accessed 2014/11/04].

JUAN, V. F.; MARCHESSI, J.E.; NUÑEZ FRE, F.R. 2011. Control de *Euphorbia davidii* (Lecherón) con glifosato. **Revista Especial de Malezas - Aapresid**, p. 61 – 67. [https://www.aapresid.org.ar/rem/wp-content/uploads/sites/3/2013/02/juan\\_marchesi.control\\_de\\_lecheroneuphorbia\\_davidii\\_con\\_glifosato.pdf](https://www.aapresid.org.ar/rem/wp-content/uploads/sites/3/2013/02/juan_marchesi.control_de_lecheroneuphorbia_davidii_con_glifosato.pdf)

JUAN, V.F.; SAINT ANDRÉ, H.M. 1995. Comportamiento de *Euphorbia dentata* en la Zona Centro de la Provincia de Buenos Aires: Biología de la Germinación y sus Efectos Competitivos sobre el Crecimiento de Soja. **Actas del XII Congreso Latinoamericano de Malezas**, Montevideo (Uruguay), INIA (Uruguay) Serie Técnica n. 56, p. 174-178. <http://www.ainfo.inia.uy/digital/bitstream/item/3018/1/st-56A-1995.pdf>.

JUAN, V.F.; SAINT ANDRÉ, H.M. 1997. Control de “Lecherón” (*Euphorbia dentata*) en soja con imazethapyr aplicado en distintos estados fenológicos. Publicado como

Trabajo completo en las Actas del **XIII Congreso Latinoamericano de Malezas**, Tomo II, p. 128-132.

JUAN, V. F.; SAINT ANDRÉ, H. M.; CARBONE, E.; ORFILA, E. N.; SCARAMUZZINO, R. L. 1996. Estudios sobre Lecherón (*Euphorbia dentata* Michaux) en la zona centro de la provincia de Buenos Aires. **Planta Daninha**, v. 14, n. 2, p. 102-109. <http://www.scielo.br/pdf/pd/v14n2/a03v14n2.pdf>.

JUAN, V.F.; SAINT-ANDRÉ, H.M.; FERNÁNDEZ, R.R. 2003. Competencia de Lecherón (*Euphorbia dentata*) en Soja. **Planta Daninha**, v. 21, p. 175-180. <http://www.scielo.br/pdf/pd/v21n2/a02v21n2>.

JUAN, V.F.; SAINT-ANDRE, H.M.; FERNANDEZ, R.R.; BAZZANO, J.; VIDELA, M. 2002. Control de *Euphorbia dentata* con diferentes formulaciones de glifosato en soja transgénica resistente a glifosato. **Revista Brasileira de Herbicidas**, v.3, n.1, p. 29-32. DOI: [dx.doi.org/10.7824/rbh.v3i1.368](https://doi.org/10.7824/rbh.v3i1.368).

JUAN, V. F.; SAINT-ANDRÉ, H. M.; FERNÁNDEZ, R. R.; VIDELA, M.; BAZZANO, J. 2000. Control de *Euphorbia dentata* en soja con herbicidas post-emergentes. **Revista Brasileira de Herbicidas**, v. 1, n. 2, p. 147-152. DOI: <https://doi.org/10.7824/rbh.v1i2.329>.

KERTESZ, M.A.; MIRLEAU, P. 2004. The role of soil microbes in plant sulphur nutrition. **Journal of experimental botany**, v. 55, n. 404, p. 1939–1945. DOI: [doi.org/10.1093/jxb/erh176](https://doi.org/10.1093/jxb/erh176).

KHALEGHIAN, A.; NAKAYA, Y.; NAZARI, H. 2011. Biodiesel production from *Euphorbia tirucalli* L. **Journal of Medicinal Plants Research**, v.5, n.19, p. 4968-4973. [http://eprints.semums.ac.ir/574/1/article1380784615\\_Khaleghian\\_et\\_al.pdf](http://eprints.semums.ac.ir/574/1/article1380784615_Khaleghian_et_al.pdf).

KISSMANN, K.G.; GROTH, D. 1992. Plantas infestantes e nocivas. São Paulo: BASF Brasileira, 792 p.

KOVALENKO, S.G.; PETRIK, S.P.; RUZHITSKAYA, I.P.; VASILEVA-NEMERTSALOVA, T.V. 1993. New species of synanthropic flora of Odessa and Black Sea ports, **Ukrainian Botanical Journal**, v. 50, n. 1, p. 114-117.

KROPÁČ, Z. 1966. Estimation of weed seeds in arable soil. **Pedobiologia**, v.6, p.105-128.

KRUSE, C.; JOST, R.; HILLEBRAND, H.; HELL, R. 2005. Sulfur rich proteins and their agrobiotechnological potential for resistance to plant pathogens. En: Proceedings of the first Sino-German workshop on aspect of sulfur nutrition of plants. Shenyang, China, **Federal Agricultural Research Centre**, Número especial 283, p. 73 - 80. [http://literatur.vti.bund.de/digbib\\_extern/bitv/zi037562.pdf#page=79](http://literatur.vti.bund.de/digbib_extern/bitv/zi037562.pdf#page=79).

KUZUHARA, Y.; ISOBE, A.; AWAZUHARA, M.; FUJIWARA, T.; HAYASHI, H. 2000. Glutathione levels in phloem sap of rice plants under sulfur deficient conditions. *Soil Science and Plant Nutrition*, v. 46, n. 1, p. 265-270. DOI: <http://dx.doi.org/10.1080/00380768.2000.10408782>.

LANGSTON, V.B.; HARGER, T.R.; JOHNSEY, P.S. 1984. Potential for adventitious regeneration of selected weed species. *Weed Science*, v. 32, n. 3, p. 360-363. <http://www.jstor.org/stable/4043947>.

LEE, Y.M.; PARK, S.H.; JUNG, S.Y.; YUN, S.M. 2009. Two new naturalized species from Korea, *Euphorbia dentata* Michx. and *Securigera varia* (L.) Lassen, **Korean Journal of Plant Taxonomy**, v.39, n.2, p. 114-119.

LEGUIZAMÓN, E. S. 1983. Dinámica poblacional de sorgo de alepo (*Sorghum halepense* L. Pers) en soja. Enfoque del estudio. Primeras estimaciones del impacto de diferentes niveles de control en el banco de propágulos. Oliveros, **Estación Experimental Agropecuaria - INTA**, Informe Técnico n. 32., 12 p.

LEVERICH W.J.; LEVIN, D.A. 1979. Age-specific survivorship and reproduction in *Phlox drummondii*. **The American Naturalist**, v. 113, n. 6, p. 881–903. DOI: doi.org/10.1086/283443.

LEVIN, D. 1990. The seed bank as a source of genetic novelty in plants. **The American Naturalist**, v. 135, n. 4, p. 563-572. DOI: doi.org/10.1086/285062.

LIN, C.C.; CHENG, H.Y.; YANG, C.M.; LIN, T.C. 2002. Antioxidant and antiviral activities of *Euphorbia thymifolia* L. **Journal of Biomedical Science**, v. 9, n. 6, p. 656-664. DOI: doi.org/10.1159/000067281.

LINSER, H.; KÜHN, U.; SCHLÖGL, G. 1964. Eine feld methode zur unterscheidung von schwefel –und stickstoffmangel, S. p. 90-102. V. Simposia Internazionale di Agrochimica su “Lazolfo in agricultura”, Palermo, Visto en MENGEL, K.; KIRKBY, E. A. Principios de Nutrición vegetal. 4<sup>ta</sup> Edición, 1<sup>o</sup> en español. Instituto Internacional del Potasio, Basilea, Suiza, 535 p., 2000.

LIU, Y.; MURAKAMI, N.; JI, H.; ABREU, P.; ZHANG, S. 2007. Antimalarial flavonol glycosides from *Euphorbia hirta*. **Pharmaceutical Biology**, v.45, n. 4, p. 278-281. DOI: dx.doi.org/10.1080/13880200701214748.

LONERAGAN, J.F.; ASHER, C.J. 1967. Response of plants to phosphate absorption and its relation to growth. **Soil science**, v. 103, n. 5, p. 311-318. Visto en MENGEL, K.; KIRKBY, E. A. Principios de Nutrición vegetal. 4<sup>ta</sup> Edición, 1<sup>o</sup> en español. Instituto Internacional del Potasio, Basilea, Suiza, 535 p., 2000.

LOUDA, S.M. 1989. Predation in the dynamics of seed regeneration. **Ecology of soil seed banks**, Academic Press, New York, p. 25-52.

LYDON, J.; DUKE, S.O. 1988. Porphyrin synthesis is required for photobleaching activity of the p-nitrosubstituted diphenyl ether herbicides. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 31, n. 1, p. 74 – 83. DOI:https://doi.org/10.1016/0048-3575(88)90031-4 .

LYNCH, J.P. 1997. Root architecture and phosphorus acquisition efficiency in common bean. En: *Radical Biology: Advances and perspectives on the function of plant roots*. **American Society of Plant Physiology**, Rockville, MD, p.81-92.

MA, J.S.; LIU, Q.R. 2003. Flora of Beijing: an overview and suggestions for future research, **Urban Habitats**, v. 1, n. 1, p. 30-44.  
[http://www.urbanhabitats.org/v01n01/beijing\\_full.html](http://www.urbanhabitats.org/v01n01/beijing_full.html)

MCMASTER, Gregory S.; WILHELM, W. W. 1997. Growing degree-days: one equation, two interpretations. **Agricultural and forest meteorology**, v. 87, n. 4, p. 291-300.

MADSEN, K.H.; HEITHOLT, J.J.; DUKE, S.O.; SMEDA, R.J.; STREIBIG, J.C. 1995. Photosynthetic parameters in glyphosate-treated sugarbeet (*Beta vulgaris* L.). **Weed Research**, v.35, n.2, p. 81–88. DOI:10.1111/j.1365-3180.1995.tb02020.x.

MALAVASI, M.M. 1988. Germinação de sementes. En: PIÑA-RODRIGUES, F.C.M. (Coord.) **Manual de análises de sementes florestais**. Campinas: Fundação Cargil, p. 44-67.

MALHI, S.S.; SCHOENAU, J.J.; GRANT, C.A. 2005. A review of sulphur fertilizer management for optimum yield and quality of canola in the Canadian Great Plains. **Canadian Journal of Plant Science**, v. 85, n. 2, p. 297-307. DOI: doi.org/10.4141/P04-140.

MARCHESSI, J.E.; SUBILS, R.; SCARAMUZZINO, R.L.; CROSTA, H.N.; ESEIZA, M.F.; SAINT ANDRÉ, H.M.; JUAN, V.F. 2011<sup>a</sup>. Presencia de *Euphorbia davidii* Subils (Euphorbiaceae) en la provincia de Buenos Aires: morfología y anatomía de la especie, **Kurtziana**, v. 36, n.1, p. 45-53.  
[http://www.scielo.org.ar/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1852-59622011000100003](http://www.scielo.org.ar/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1852-59622011000100003).

MARCHESSI, J.; CROSTA, H.; JUAN, V.; FERNANDEZ, O.A.; BENTIVEGNA, D. 2011<sup>b</sup>. Efecto de la Temperatura sobre la germinación de *Euphorbia davidii* Subils. 2<sup>a</sup> **Reunión Conjunta de Sociedades de Biología de la República Argentina, XIII Jornadas de la Sociedad Argentina de Biología, XXIX Reunión Anual de la Sociedad de Biología de Cuyo y XVIII Jornadas Científicas de la Sociedad de Biología de Córdoba**, Summary published in Revista Biocell, v.3, n.35, p. A 237, EB33.

MARSCHNER, H. 1995. **Mineral nutrition of higher plants**. Second edition. London Academic Press, 889 p.

MARTINS, C.C.; SILVA, W.R. 1994. Estudos de bancos de sementes do solo. **Informativo ABRATES**, v.4, n. 1, p.49-56.

MATTEUCCI, S.D.; COLMA, A. 1982. **Metodología para el estudio de la vegetación**. Secretaría General de la Organización de los Estados Americanos, Programa Regional de Desarrollo Científico y Tecnológico, 163 p.

MAYFIELD, M.H. 1997. **A systematic treatment of *Euphorbia* subgenus *Poinsettia* (*Euphorbiaceae*)**. Dissertation Presented to the Faculty of the Graduate School of The University of Texas at Austin in Partial Fulfillment of the Requirements for the Degree of Doctor of Philosophy.

MC IVOR, J.G.; HOWDEN, S.M. 2000. Dormancy and germination characteristics of herbaceous species in the seasonally dry tropics of northern Australia. **Austral Ecology**, v. 25, n. 3, p. 213-222. DOI: 10.1046/j.1442-9993.2000.01026.x.

MENENDEZ, J.; GONZALEZ GUTIERREZ, J.; DE PRADO, R. 1999. Factores que afectan a la eficacia del glifosato. **Agricultura: Revista agropecuaria**, n. 799, p. 146-149.

[http://www.mapama.gob.es/ministerio/pags/Biblioteca/Revistas/pdf\\_Agri%2FAgri\\_1999\\_799\\_146\\_149.pdf](http://www.mapama.gob.es/ministerio/pags/Biblioteca/Revistas/pdf_Agri%2FAgri_1999_799_146_149.pdf).



MENGEL, K.; KIRKBY, E. A. 2000. Principios de Nutrición vegetal. 4<sup>ta</sup> Edición, 1<sup>o</sup> en español. Instituto Internacional del Potasio, Basilea, Suiza, 535 p.

MESCHEDE, D. K.; OLIVEIRA JR, R.S.; CONSTANTIN, J.; SCAPIM, C.A. 2002. Critical period of interference of *Euphorbia heterophylla* in soybean crop under low seeding rate. **Planta Daninha**, v. 20, n. 3, p. 381-387. DOI: dx.doi.org/10.1590/S0100-83582002000300008.

MESSICK, D. L.; FAN, M.X.; DE BREY, C. 2005. Global sulfur requirement and sulfur fertilizer. Número especial. 283. En: Proceedings of the first Sino-German workshop on aspect of sulfur nutrition of plants. Shenyang, China, **Federal Agricultural Research Centre**, p. 97-104.  
[http://literatur.vti.bund.de/digbib\\_extern/bitv/zi037562.pdf#page=103](http://literatur.vti.bund.de/digbib_extern/bitv/zi037562.pdf#page=103).

MIKHEEV, A.D. 1971. The American weed *Euphorbia dentata* Michx. in the Soviet Union, **Botanicheskii Zhurnal. Moscow & Leningrad**, v.56, n.11, p.1643-1644.

MIMURA, T. 1999. Regulation of phosphate transport and homeostasis in plant cells. **International Review of Cytology**, v. 191, p. 149-200. DOI: doi.org/10.1016/S0074-7696(08)60159-X.

MISSOURI BOTANICAL GARDEN  
<http://www.tropicos.org/name/50144590?projectid=23> (accessed 24.05.2016).

MITHILA, J.; SWANTON, C.J.; BLACKSHAW, R.E.; CATHCART, R.J.; HALL, J.C. 2008. Physiological basis for reduced glyphosate efficacy on weeds grown under low soil nitrogen. **Weed Science**, v.56, n.1, p.12-17. DOI: doi.org/10.1614/WS-07-072.1.

MOHAMED, S.; SAKA, S.; EL-SHARKAWY, S.H.; ALI, A.M.; MUID, S. 1996. Antimycotic screening of 58 Malaysian plants against plant pathogens. **Pest Management Science**, v. 47, n. 3, p. 259-264. DOI: 10.1002/(SICI)1096-9063(199607)47:3<259::AID-PS413>3.0.CO;2-N.

- MOHLER, C.L.; FRISCH, J.C.; MCCULLOCH, C.E. 2006. Vertical movement of weed seed surrogates by tillage implements and natural processes. **Soil and Tillage Research**, v. 86, n. 1, p. 110-122. DOI: doi.org/10.1016/j.still.2005.02.030.
- MOLA, L.; ÁLVAREZ, A. 2002.Efectos alelopáticos de cuatro especies de la familia Euphorbiaceae en los cultivos de maíz (*Zea mays* L.), tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.) y bejuco marrullero (*Urechites lutea* L.). **Revista de Protección Vegetal**, n.2132.
- MONTEITH, J.L.; MOSS, C.J. 1977. Climate and the efficiency of crop production in Britain. **Philosophical Transactions of the Royal Society**, v. 281, n. 980, p. 277-294. DOI: 10.1098/rstb.1977.0140.
- MOSYAKIN, S.L., YAVORSKA O.G. 2002. The nonnative flora of the Kyiv (Kiev) urban area, Ukraine: a checklist and brief analysis, **Urban Habitats**, v. 1, p. 45-65. [http://www.urbanhabitats.org/v01n01/nonnativekiev\\_full.html](http://www.urbanhabitats.org/v01n01/nonnativekiev_full.html)
- MUELLER, T.C.; ELLIS, A.T.; BEELER, J.E.; SHARMA, S.D.; SINGH, M. 2008. Shikimate accumulation in nine weedy species following glyphosate application. **Weed Research**, v.48, n.5, p.455 – 460. DOI: 10.1111/j.1365-3180.2008.00648.x.
- MUELLER, T.C.; MASSEY, J.H.; HAYES, R.M.; MAIN, C.L.; STEWART, C.N. 2003. Shikimate accumulates in both glyphosate-sensitive and glyphosate-resistant horseweed (*Conyza canadensis* L. Cronq.). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 51, n.3, p.680 – 684. DOI: 10.1021/jf026006k.
- MYRZA, M.V.; ŞABANOVA, G.A. 1992. New scarce and adventive plants in Moldavian flora, **Rez. Lucr. Congr. Naț. Biol. "Emil Racoviță"**, Iași, v. 1, p. 36-37.
- NCEDANA, C. 2011. **Soil factors affecting glyphosate efficacy in *Lolium spp.*** Thesis for the degree Master of Agricultural Science. University of Stellenbosch, p. 1-13. <http://scholar.sun.ac.za/handle/10019.1/17951>.

NESTER, P.R.; HARGER, T.R.; McCORMICK, L.L. 1979. Weed watch -wild poinsettia, **Weeds Today**, v. 11, n. 1, p. 24- 25.

NOORI, M.; CHEHREGHANI, A.; KAVEH, M. 2009. Flavonoids of 17 species of *Euphorbia* (Euphorbiaceae) in Iran, **Toxicological & Environmental Chemistry**, v. 91, n. 4, p. 631-641. DOI: [dx.doi.org/10.1080/02772240802389936](https://doi.org/10.1080/02772240802389936).

NUÑEZ FRE, F.R.; JUAN, V.F.; CHANTRE, G. 2014. Distribución vertical del banco de semillas de *Euphorbia davidii* Subils, en lotes agrícolas de la zona centro de la provincia de Buenos Aires, Argentina. **Planta daninha**, v. 32, n. 4, p. 709 – 718. DOI: 10.1590/S0100-83582014000400005.

OLSEN, S. R.; WATANABE, F. S. 1970. Diffusive supply of phosphorus in relation to soil textural variations. **Soil Science**, v. 110, n. 5, p. 318-327. Visto en MENGEL, K.; KIRKBY, E. A. Principios de Nutrición vegetal. 4<sup>ta</sup> Edición, 1<sup>o</sup> en español. Instituto Internacional del Potasio, Basilea, Suiza, 535 p. 2000.

OPREA, A. 1997. A new species for the Romanian Flora: *Euphorbia dentata* Michx, **Stud. Cerc. Biol.**, v. 49, p. 97-98.

OPREA, A.; BARINA, Z.; SIRBU, C. 2012. *Euphorbia davidii* Subils (Euphorbiaceae) – An alien species new to Romanian flora. **Contribuții Botanice**, v. 47, p. 7-12. <http://www.cabi.org/isc/FullTextPDF/2013/20133005733.pdf>.

PARKER, V.T.; SIMPSON, R.L.; LECK, M.A. 1989. Pattern and process in the dynamics of seed banks. En: Leck, M.A.; Parker, V.T. & Simpson, R.L. (ed.) **Ecology of Soil Seed Banks**. Academic Press, New York, p .367-384.

PATEL, S.B.; NAIKWADE, N.S.; MAGDUM, C.S. 2009. Review on phytochemistry and pharmacological aspects of *Euphorbia hirta* L., **Asian Journal of Pharmaceutical Research and Health Care**, v. 1, n.1, p. 113-13. DOI: [doi.org/10.18311/ajprhc/2009/622](https://doi.org/10.18311/ajprhc/2009/622).

PEARL, R. 1928. **The Rate of Living: Being an account of some experimental studies of the biology of life duration.** John Hopkins University. Ed. Alfred A. Knopf, New York. 226 p.

PEMBERTON, R.W.; IRVING, D.W. 1990. Elaiosomes on weed seeds and the potential for myrmecochory in naturalized plants. **Weed Science**, v. 38, n. 6, p. 615-619. DOI: <https://doi.org/10.1017/S0043174500051584>.

PÉREZ-JONES, A.; PARK, K.W.; POLGE, N.; COLQUHOUN, J.; MALLORY-SMITH, C.A. 2007. Investigating the mechanisms of glyphosate resistance in *Lolium multiflorum*. **Planta**, v. 226, n. 2, p. 395 – 404. DOI: 10.1007/s00425-007-0490-6.

PERRY, D.A. 1984. Manual de métodos de ensayos de vigor. Publicación Española. **Instituto Nacional de semillas y Plantas de Vivero**. p. 45-51.

PLANEAR (on line). **Plantas Endémicas de la Argentina**. Disponible en: <http://www.lista-planear.org> [accessed 2014/12/10].

PLANTNET (The NSW Plant Information Network System). **Royal Botanic Gardens and Domain Trust, Sydney**. Disponible en: <http://plantnet.rbgsyd.nsw.gov.au/cgi-bin/NSWfl.pl?page=nswfl&lvl=sp&name=Euphorbia~davidii> [accessed 2017/03/04].

PLINE, W.A.; WILCUT, J.W.; DUKE, S.O.; EDMISTEN, K.L.; WELLS, R. 2002. Tolerance and accumulation of shikimic acid in response to glyphosate applications in glyphosate - resistant and nonglyphosate-resistant cotton (*Gossypium hirsutum* L.). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, n. 3, p. 506 – 512. DOI: 10.1021/jf0110699.

POLDINI, L.; BARBO, M.; DANELUTTO, A. 1996. Segnalazioni Floristiche Italiane: 821. *Euphorbia dentata* Michaux. (Euphorbiaceae). **Inf. Bot. Ital.**, v. 28, n. 1, p. 96-97.

- PURGER, D.; VAJGAND, D.; MIĆIĆ, N.; VAJGAND, K. 2015. *Euphorbia davidii* Subils (Euphorbiaceae), a new alien species in the flora of Serbia. **Botanica Serbica**, v. 39, n. 1, p. 49-52. [http://botanicaserbica.bio.bg.ac.rs/arhiva/pdf/2015\\_39\\_1\\_625\\_full.pdf](http://botanicaserbica.bio.bg.ac.rs/arhiva/pdf/2015_39_1_625_full.pdf).
- RABINOVICH, J.E. 1980. **Introducción a la Ecología de Poblaciones Animales**. Compañía Editorial Continental, México, 313 p.
- RAGHAVENDRA, A.S.; DAS, V.S.R. 1978. The occurrence of C4 photosynthesis: A supplementary list of C4 plants reported during late 1974 – mid 1977. **Photosynthetica**, v. 12, n. 2, p. 200-208.
- RAGHOTHAMA, K.G. 1999. Phosphate acquisition. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, v. 50, n. 1, p. 665-693. DOI: <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.50.1.665>.
- RAHMAN, A. 1978. Influence of phosphorus on the phytotoxicity of alachlor. **New Zealand Journal of Agricultural Research**, v. 21, n. 4, p. 687-690. DOI: [dx.doi.org/10.1080/00288233.1978.10427467](https://doi.org/10.1080/00288233.1978.10427467).
- RÉDEI, D.; KÚSZ, N.; SZABÓ, M.; PINKE, G.; ZUPKÓ, I.; HOHMANN, J. 2015. First phytochemical investigation of secondary metabolites of *Euphorbia davidii* Subils and antiproliferative activity of its extracts. **Acta Biologica Hungarica**, v. 66, n. 4, p. 464-467. DOI: [doi.org/10.1556/018.66.2015.4.11](https://doi.org/10.1556/018.66.2015.4.11).
- REISENAUER, H. M.; WALSH, L. M.; HOEFT, R. G. 1973. Testing soils for sulphur, boron, molybdenum, and chlorine. **Soil testing and plant analysis**, p. 173-200. Visto en MENGEL, K.; KIRKBY, E. A. Principios de Nutrición vegetal. 4<sup>ta</sup> Edición, 1<sup>o</sup> en español. Instituto Internacional del Potasio, Basilea, Suiza, 535 p., 2000.
- REPSOL. 2016. **Proyecto EULA FUEL**  
<[https://www.repsol.com/es\\_es/corporacion/conocer-repsol/canal-tecnologia/proyectos-innovadores/otros-proyectos/eulafuel.aspx](https://www.repsol.com/es_es/corporacion/conocer-repsol/canal-tecnologia/proyectos-innovadores/otros-proyectos/eulafuel.aspx)> (Visitado 04/06/2016).

- REQUESENS, E.; MARTINEFSKY, M. J.; SCARAMUZZINO, R. 2004. Banco de semillas de malezas a lo largo de un gradiente microtopográfico en un suelo agrícola de Azul (Buenos Aires). **Ecología Austral**, v. 14, n. 2. p. 141-147, Disponible en: <[http://www.scielo.org.ar/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1667-782X2004000200006&lng=es&nrm=iso](http://www.scielo.org.ar/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1667-782X2004000200006&lng=es&nrm=iso)>. ISSN 1667-782X.
- RICKLEFS, R.E. 1990. Seabird life histories and the marine environment: some speculations. **Colonial Waterbirds**, v. 13, n. 1, p. 1-6. DOI: 10.2307/1521414.
- ROBERTS, H. A. 1981. Seed banks in the soil. **Advances in Applied Biology**, v. 6, n. 1, p. 1-55.
- ROBERTS, H. A.; DAWKINS, P. A. 1967. Effect of cultivation on the number of viable weed seeds in soil. **Weed Research**, v. 7, n. 4, p. 290-301. DOI: 10.1111/j.1365-3180.1967.tb01384.x.
- RUBIN, J.L.; GAINES, C.G.; JENSEN, R.A. 1982. Enzymological Basis for Herbicidal Action of Glyphosate. **American Society of Plant Biologists**, v. 70, n. 3, p. 833 – 839. DOI: 10.1104/pp.70.3.833.
- RUSSELLE, M.P.; WILHELM, W.W.; OLSON, R.A.; POWER, J.F. 1984. Growth analysis based on degree days. **Crop Science**, v. 24, n. 1, p. 28-32. DOI: 10.2135/cropsci1984.0011183X002400010007x.
- SALISBURY, F.B.; ROSS, C.W. 1991. **Fisiología Vegetal**. Editorial Iberoamérica. 759 p.
- SCOTT, N.M.; ANDERSON, G. 1976. Sulphur, carbon and nitrogen contents of organic fractions from acetylacetone extracts of soils. **European Journal of Soil Science**, v. 27, n. 3, p. 324-330. DOI: 10.1111/j.1365-2389.1976.tb02003.x.

- SEEFELDT, S.S.; JENSEN, J. E.; FUERST, E.P. 1995. Log-logistic analysis of herbicide dose-response relationships. **Weed Technology**, v.9, n.2, p. 218 – 227. <http://www.jstor.org/stable/3987736>.
- SHI, Q.W.; SU, X.H.; KIYOTA, H. 2008. Chemical and pharmacological research of the plants in genus *Euphorbia*, **Chemical reviews**, v. 108, n. 10, p. 4295-4327. DOI: 10.1021/cr078350s.
- SHI, Y.P.; JIA, Z.J. 1997. Recent studies on diterpene esters and their bioactivities from *Euphorbia* genus in China, **Chemical Journal of Chinese Universities-chinese**, v. 18, n. 7, p. 1107-1112. <http://ir.lzu.edu.cn/handle/262010/81709>.
- SILVERTOWN, J. W. 1982. **Introduction to plant population ecology**. London Longman Group, 209 p.
- SIMON-SYLVESTRE, G. 1972. Sulfur in soils, its evolution. Inter. Symp. on Sulfur in Agriculture, Versailles, **Annales Agronomiques**, v. 72, n. 1, p. 181-199. Visto en
- MENGEL, K.; KIRKBY, E. A. Principios de Nutrición vegetal. 4<sup>ta</sup> Edición, 1<sup>o</sup> en español. Instituto Internacional del Potasio, Basilea, Suiza, 535 p., 2000.
- SINGH, B.; SHANER, D. 1998. Rapid determination of glyphosate injury to plants and identification of glyphosate-resistant plants. **Weed Technology**, v. 12, n. 3, p. 527 - 530, DOI: 10.1017/S0890037X00044250.
- SIVORI, E.M.; MONTALDI, E.R.; CASO, O.H. 1980. **Fisiología Vegetal**. Hemisferio Sur, Argentina, 681 p.
- SOAUD, A.A.; AL DARWISH, F.H.; SALEH, M.E.; EL-TARABILY, K.A.; SOFIAN-ARIZUM, M.; RAHMAN, M.M. 2011. Effects of elemental sulfur, phosphorous micronutrients and *Paraccocus versutus* on nutrient availability of calcareous soils. **Australian Journal of Crop Science**, v. 5, n. 5, p. 554-561. [http://www.cropj.com/rahman\\_5\\_5\\_2011\\_554\\_561.pdf](http://www.cropj.com/rahman_5_5_2011_554_561.pdf).

STEVENSON, F.J.; COLE, M.A. 1999. **Cycles of Soil: Carbon, Nitrogen, Phosphorus, Sulfur, Micronutrients**, John Wiley & Sons, 2nd edition, 448 p.

STORRIE A.M.; COOK A.S. 1996. Distribution and herbicide options for the management of *Euphorbia davidii* Subils., En: **11<sup>th</sup> Australian Weeds Conference proceedings: where in the world is weed science going?**, Weed Science Society of Victoria, p. 93–96. <http://caws.org.au/awc/1996/awc199610931.pdf>.

STREIBIG, J.C.; RUDEMO, M.; JENSEN, J.E. 1993. Dose-response curves and statistical models. En: Streibig, J.C.; Kudsk, P. editors. **Herbicide Bioassays**. CRC Press, p. 29–55.

SUBILS, R. 1977. Las especies de *Euphorbia* de la República Argentina, **Kurtziana**, v. 10, p. 83-248.

SUBILS, R. 1984. Una nueva especie de *Euphorbia* Sect *Poinsettia* (*Euphorbiaceae*), **Kurtziana**, v. 17, p. 125-130.

SULYOK, E.; VASAS, A.; REDEI, D.; FORGO, P.; KELE, Z.; PINKE, G.; HOHMANN, J. 2011. New premyrsinane-type diterpene polyesters from *Euphorbia falcata*, **Tetrahedron**, v. 67, n. 38, p. 7289-7293. DOI: [doi.org/10.1016/j.tet.2011.07.051](https://doi.org/10.1016/j.tet.2011.07.051).

SZAREK, S.R. 1979. The occurrence of crassulacean acid metabolism: A supplementary list during 1976 to 1979. **Photosynthetica**, v. 13, n. 4, p. 467-473.

TANVEER, A., REHMAN, A., JAVAID, M.M., ABBAS, R.N., SIBTAIN, M., AHMAD, A.U. H.; IBIN-I-ZAMIR, M.S.; CHAUDHARY, K.M.; AZIZ, A. 2010. Allelopathic potential of *Euphorbia helioscopia* L. against wheat (*Triticum aestivum* L.), chickpea (*Cicer arietinum* L.) and lentil (*Lens culinaris* Medic.). **Turkish Journal of Agriculture and Forestry**, v. 34, n. 1, p. 75-81. DOI: 10.3906/tar-0903-53.



- TANVEER, A.; KHALIQ, A.; JAVAID, M.M.; CHAUDHRY, M.N.; AWAN, I. 2013. Implications of weed genus *Euphorbia* for crop production: a review. **Planta Daninha**, v. 31, n.3, p.723-731. DOI: [dx.doi.org/10.1590/S0100-83582013000300024](https://doi.org/10.1590/S0100-83582013000300024).
- TAYLOR, K.; HARTZLER, R. 2000. Effect of seed bank augmentation on herbicide efficacy. **Weed Technology**, v. 14, n. 2, p. 261-267. DOI: [doi.org/10.1614/0890-037X\(2000\)014\[0261:EOSBAO\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1614/0890-037X(2000)014[0261:EOSBAO]2.0.CO;2).
- THOMPSON, K.; GRIME, J.P. 1979. Seasonal variation in the seed banks of herbaceous species in ten contrasting habitats. **Journal of Ecology**, v. 67, n. 3, p. 893-921. DOI: [10.2307/2259220](https://doi.org/10.2307/2259220).
- TILL, A.R. 2010. **Sulphur and sustainable agriculture**. International Fertilizer Industry Association. Primera edición. Paris, Francia. ISBN: 978-2-9523139-6-4, 70 p.
- TRUDGILL, D.L.; HONEK, A.; LI, D.; VAN STRAALEN, N.M. 2005. Thermal time—concepts and utility. **Annals of Applied Biology**, v. 146, n. 1, p. 1-14. DOI: [10.1111/j.1744-7348.2005.04088.x](https://doi.org/10.1111/j.1744-7348.2005.04088.x).
- UPCHURCH, R.P.; LEDBETTER, G.R.; SELMAN, F.L. 1963. The interaction of phosphorus with the phytotoxicity of soil applied herbicides. **Weeds**, v. 11, n. 1, p. 36-41. DOI: [10.2307/4040681](https://doi.org/10.2307/4040681).
- VELINI, E.D.; ALVES, E.; GODOY, M.C.; MESCHÉDE, D.K.; SOUZA, R.T.; DUKE, S.O. 2008. Glyphosate applied at low doses can stimulate plant growth. **Pest Management Science**, v. 64, n. 4, p. 489 – 496. DOI: [10.1002/ps.1562](https://doi.org/10.1002/ps.1562).
- VERLOOVE, F. 2006. **Catalogue of neophytes in Belgium (1800-2005)**, Scripta Botanica Belgica, CIP Royal Library Albert I, v. 39, 89 p., <http://www.vliz.be/imisdocs/publications/225424.pdf>.
- VESTENA, S.; NOBREGA, P.G. SATHLER, J.G.; BITENCOURT, A.H.C. 2016. Efeito alelopático do extrato aquoso do leiteiro (*Euphorbia heterophylla* L.) sobre a

- germinação de sementes de soja (*Glycine max* (L.) Merr.) e de ervilha (*Pisum sativum* L.). **Revista Científica da Faminas**, v. 2, n. 2, p. 21-28. <http://periodicos.faminas.edu.br/index.php/RCFaminas/article/view/164/144>.
- VIDAL, R.A.; TREZZI, M. M.; DE PRADO, R.; RUIZ-SANTAELLA, J.P.; VILA-AIUB, M. 2007. Glyphosate resistant biotypes of wild poinsettia (*Euphorbia heterophylla* L.) and its risk analysis on glyphosate-tolerant soybeans. **Journal of Food, Agriculture and Environment**, v. 5, n. 2, p. 265 – 269.
- VILLIERS, T. A. 1972. Seed dormancy. En: KOSLOWSKI, T. T. (Ed.) **Seed biology**. New York Academic Press, v. 2, p. 220-281.
- VLADIMIROV, V.; PETROVA, A.S. 2009. A new alien species of *Euphorbia* (*Euphorbiaceae*) to the Bulgarian flora. **Phytologia Balcanica**, v. 15, n. 3, p. 343-345.
- VOLL, E.; GAZZIERO, D.L.P.; KARAM, D. 1996. Dinâmica de populações de *Brachiaria plantaginea* (Link) HITCH. Sob manejo de solo e de herbicidas: 2. Emergência. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 31, n. 1, p.27-35. [https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/CNPSO/19660/1/pab96jan\\_03.pdf](https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/CNPSO/19660/1/pab96jan_03.pdf).
- WALD, J.; KRONBERG, S. L.; LARSON, G. E.; JOHNSON, W. C. 2005. Dispersal of Leafy Spurge (*Euphorbia esula* L.) seeds in the feces of wildlife. **The American Midland Naturalist**, v. 154, n. 2, p. 342-357. DOI: [doi.org/10.1674/0003-0031\(2005\)154\[0342:DOLSEE\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1674/0003-0031(2005)154[0342:DOLSEE]2.0.CO;2).
- WEBSTER, G.L.; BROWN, W.V.; SMITH, B.N. 1975. Systematics of photosynthetic carbon fixation pathways in *Euphorbia*. **Taxon**, v. 24, n. 1, p. 27-33. <http://www.jstor.org/stable/1218995>.
- WHITEHEAD, D.C. 1964. Soil and plant-nutrition aspects of the sulphur cycle. **Soils and fertilizers**, v. 27, n. 1, p.1-8. Visto en MENGEL, K.; KIRKBY, E. A. Principios de

Nutrición vegetal. 4<sup>ta</sup> Edición, 1<sup>o</sup> en español. Instituto Internacional del Potasio, Basilea, Suiza, 535 p., 2000.

WILLARD, T.S.; GRIFFIN, J.L. 1993. Soybean (*Glycine max*) yield and quality responses associated with Wild Poinsettia (*Euphorbia heterophylla*) control programs. **Weed Technology**, v. 7, n. 1, p. 118-122. DOI: 10.1017/S0890037X00036976.

WILLIAMS, E. G. 1970. Factors affecting the availability of soil phosphate and efficiency of phosphate fertilizers. En **An Anglo-Soviet Symposium on Agrochemical Research and the Use of Mineral Fertilizer in Moscow**. Visto en MENGEL, K.; KIRKBY, E. A. Principios de Nutrición vegetal. 4<sup>ta</sup> Edición, 1<sup>o</sup> en español. Instituto Internacional del Potasio, Basilea, Suiza, 535 p., 2000.

WILLIAMS, J.S.; HALL, S.A.; HAWKESFORD, M.J.; BEALE, M.H.; COOPER, R.M. 2002. Elemental sulphur and thiol accumulation in tomato and defense against a fungal vascular pathogen. **Plant Physiology**, v. 128, n. 1, p. 150-159. DOI: 10.1104/pp.010687.

WILSON, A.K. 1981. *Euphorbia heterophylla*: a review of distribution, importance and control. **International Journal of Pest Management**, v.27, n.1, p. 32-38. DOI: dx.doi.org/10.1080/09670878109414169.

WILSON, H. P.; STEWART, F. B. 1973. Relationship between trifluralin and phosphorus on transplanted tomatoes. **Weed Science**, v. 21, n. 2, p. 150-153. DOI: doi.org/10.1017/S0043174500031969.

WIN S.S.; MUHAMAD, R.; AHMAD, Z.A.M; ADAM, N.A. 2009. Life table and population parameter of *Sogatella furcifera* (Horvath) (Homoptera: Delphacidae) on rice. **Journal of Biological Sciences**, v. 9, n. 8, p. 904-908. DOI: 10.3923/jbs.2009.904.908.

YANNICCARI, M.; ISTILART, C.; GIMÉNEZ, D.O.; CASTRO, A.M. 2012. Glyphosate resistance in perennial ryegrass (*Lolium perenne* L.) from Argentina. **Crop Protection**, v. 32, p. 12 – 16. DOI: 10.1016/j.cropro.2011.09.021.

YENA, A.V. 2011. *Euphorbia davidii* Subils, p. 317. En: GREUTER, W.; RAUS, T. (ed.): Med-Checklist Notulae, **Willdenowia**, v. 41, p. 311-328.

YENISH, J.P.; DOLL, J D.; BUHLER, D.D. 1992. Effects of tillage on vertical distribution and viability of weed seed in soil. **Weed Science**, v. 40, n. 3, p.429-433. DOI: 10.1017/S0043174500051869.

YOSHIDA, S.; TAZAKI, K.; MINAMIKAWA, T. 1975. Occurrence of shikimate and quinic acids in angiosperms. **Phytochemistry**, v. 14, n. 1, p.195 – 197. DOI: 10.1016/0031-9422(75)85036-9.