

3 C.14 - INFLUENCIA DE LA EDAD DE LA PLANTA Y LA TEMPERATURA DE CRECIMIENTO DE *COMMELINA ERECTA* SOBRE LA CANTIDAD Y DISTRIBUCIÓN DE CERAS EPICUTICULARES Y LA TOLERANCIA A GLIFOSATO

M. Traggiay¹, I. Dellaferrera¹, R. De Prado², M. Perreta¹

1Morfología Vegetal (FCA– UNL), Kreder 2805 – 3080 Esperanza, Argentina,
mperreta@fca.unl.edu.ar

²Departamento de Química Agrícola – UCO. 14071. Córdoba, España.

Resumen: La tolerancia de *Commelina erecta* L. varía con el estado de desarrollo, es mayor cuando la maleza es adulta. Las ceras epicuticulares, una de las barreras protectoras de la planta, varían en calidad, cantidad y distribución con la edad de la planta y pueden ser modificadas por las condiciones ambientales. El objetivo del trabajo fue determinar la cantidad y distribución de las ceras epicuticulares de *C. erecta* en función de la edad de la planta y de diferentes condiciones térmicas de crecimiento a fin de relacionar las mismas con la tolerancia a glifosato de esta especie. Se trabajó en cámara de crecimiento con plantas obtenidas de semilla y plantas clonadas, las condiciones de temperatura fueron 25/15 °C y 35/25 °C, día/noche con un fotoperíodo de 14 hs y se les aplicó una dosis de glifosato de 1200 g i.a./ha. Se trabajó en base a características de la superficie foliar analizadas con MEB y ESEM y de anatomía. No se observaron daños en plantas adultas tratadas para ambas temperaturas ni en las plántulas crecidas a altas temperaturas. Las plántulas desarrolladas a temperatura baja mostraron una marcada clorosis, correlacionada con una disminución en el número y coloración de los cloroplastos. A altas temperaturas se observó una mayor cantidad de ceras depositadas, tanto en planta adulta como en plántulas, aunque que es menor en las segundas. Existiría una correlación positiva entre edad de la planta, temperatura de crecimiento y cantidad de ceras que afecta el grado de tolerancia de esta especie.

Palabras clave: malezas tolerantes a glifosato, anatomía foliar, ceras, clorosis

INTRODUCCIÓN

En la región sojera de Argentina la siembra directa y el uso continuo de glifosato han generado cambios en las relaciones de dominancia dentro de las comunidades de malezas, con un aumento en la proporción de especies tolerantes a dicho herbicida (VITTA *et al.*, 2004). Entre las especies de mayor difusión tolerantes al glifosato figura *Commelina erecta* (RAINERO, 2004; VITTA *et al.* 2004). La tolerancia de *C. erecta* varía con el estado de desarrollo, es mayor cuando la maleza es adulta o en plantas pequeñas perteneciente a rebrotes de una planta ya establecida, y es menor en plántula de 5 hojas o menos (RAINERO, 2004; PANIGO, 2007). Las causas de esta tolerancia diferencial no son aún conocidas.

La tolerancia al glifosato, en algunas especies, se debe a una menor penetración del mismo o a una traslocación diferencial (SATICHIVI *et al.*, 2000; CHACHALIS *et al.*, 2001); además las condiciones ambientales, fundamentalmente, la temperatura y la humedad, también influyen en la absorción y traslocación del glifosato (SHARMA & SING, 2001). Varias características de la superficie foliar fueron relacionadas con barreras a la penetración de herbicidas: densidad de estomas y

tricomas, ceras epicuticulares y espesor de la cutícula (MONQUERO *et al.*, 2004). En varias especies se encontró que la mayor tolerancia a los herbicidas era consecuencia de una mayor cantidad de ceras superficiales, las que bloqueaban la absorción (LIAKOPOLUS *et al.*, 2001). En *Commelina benghalensis* se estableció que el principal mecanismo de tolerancia al glifosato fue la absorción diferencial relacionada con características de las ceras epicuticulares, y la presencia de un metabolismo diferencial (MONQUERO *et al.*, 2004).

La estructura de la cutícula es muy heterogénea. La edad de la hoja es un factor importante de variación: a medida que ésta aumenta, existe un incremento en la deposición de los distintos componentes constituyentes de la cutícula (HULL *et al.*, 1975), aumentando la proporción de compuestos hidrofóbicos y disminuyendo los hidrofílicos (CHACHALIS *et al.*, 2001). Además, la cantidad y distribución de ceras puede ser modificada por las condiciones ambientales (HULL *et al.*, 1975; BARTHLOTT *et al.*, 1998), como por ejemplo la temperatura. A medida que aumenta la temperatura aumenta la cantidad de ceras epicuticulares y se modifica también su estructura (HULL *et al.*, 1975).

El objetivo del trabajo fue determinar la cantidad y distribución de las ceras epicuticulares de *C. erecta* en función de la edad de la planta y de diferentes condiciones térmicas de crecimiento a fin de relacionar las mismas con la tolerancia a glifosato de esta especie.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se trabajó en cámara de crecimiento con plantas obtenidas de semilla sembradas en macetas que contenían suelo limoso (Argiudol Típico serie Esperanza), las condiciones de temperatura fueron 25/15 °C y 35/25 °C, día/noche con un fotoperíodo de 14 hs. Se aplicó sal isopropanilamina de glifosato (48% p/v) (Estrella, Ciagro) a presión constante en un volumen de agua correspondiente a 200 l.ha⁻¹ en una dosis de 1200 g i.a./ha a dos grupos de plantas: plántulas (5-6 hojas, 1 ramificación primaria) y plantas adultas (más de 7 hojas, más de 1 ramificación primaria, eje principal en floración).

Para los estudios de microscopía electrónica se utilizó la parte media de la segunda y tercer hoja completamente expandida. Las muestras se secaron al aire y se adhirieron con pintura de plata sobre portamuestras metálicos y posteriormente se recubrieron con oro depositado por sputtering y se examinaron con un Microscopio Electrónico de Barrido marca JEOL, modelo JSM-35C. También se utilizó un Microscopio Electrónico de Barrido Ambiental ElectroScan 2010 para observar material fresco.

Para la cuantificación de las ceras epicuticulares se utilizaron hojas enteras de plantas adultas desarrolladas a baja y alta temperatura (30 hojas por tratamiento tomadas de 10 plantas x 3 repeticiones), a las que se les extrajo la cera mediante una inmersión en cloroformo durante 15 segundos. Luego se dejó evaporar el cloroformo hasta obtener el residuo correspondiente, el que fue pesado. Previo a la extracción se determinó la superficie foliar. Se realizó la comparación de los tratamientos y se utilizó el test de T (p 0,05) para evaluar diferencias.

Para los estudios anatómicos a los 15 días post-aplicación del herbicida se cosechó última hoja expandida presente al momento de la aplicación, de plantas adultas y plántulas tratadas y no tratadas, las que fueron fijadas en una solución de Formol-Alcohol-Acética (FAA), deshidratadas con una serie creciente de alcoholes y puestas en parafina-cera. Se efectuaron cortes normalizados de la semilamina con micrótopo rotativo que fueron coloreados con safranina-fast green. Se tomaron imágenes digitales de los mismos con una cámara Nikon Coolpix 990 en un microscopio Olympus CH30.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Exteriormente las plantas adultas tratadas desarrolladas a baja y alta temperatura no mostraron síntomas marcados, sólo una leve clorosis en algunas hojas que no afectó el normal crecimiento de las plantas. Las plántulas tratadas, independientemente de la temperatura de desarrollo,

mostraron una disminución en la tasa del crecimiento comparada con las no tratadas, pero en ningún caso se observó la muerte de las mismas. En el caso de las plántulas, se observó mayor daño en las desarrolladas a temperatura baja que mostraron una clorosis localizada en la base de la lámina en algunos casos y en la totalidad de la misma en otros. A nivel de tejidos se comprobó lo observado exteriormente. No hubo daños en plantas adultas tratadas para ambas temperaturas ni en plántulas crecidas a alta temperatura. En las plántulas desarrolladas a temperatura baja se observó que presentan una disminución marcada en el número y coloración de los cloroplastos por efecto del glifosato. Se observó también un colapso de los espacios intercelulares a nivel del parénquima lagunar, lo que le da al mesófilo un aspecto compacto. Este efecto del glifosato es similar al observado en *C. difusa* y *C. benghalensis* donde el mesófilo se desorganiza, fundamentalmente el lagunoso, y luego las células mueren lo que exomorfológicamente se traduce en el pasaje de áreas cloróticas a necrosadas (TUFFI SANTOS *et al.*, 2004).

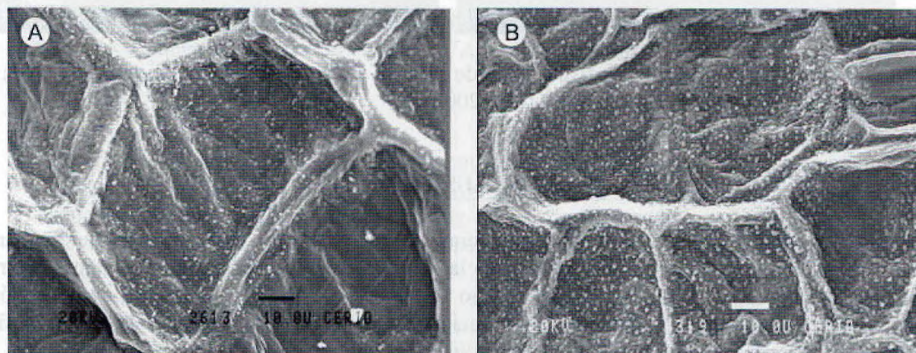


Figura 1: Variación en la cantidad y distribución de ceras en plantas jóvenes. A, desarrolladas a temperatura baja; B, desarrolladas a temperatura alta. Imágenes tomadas con MEB 1200x.

La temperatura es el factor que se piensa influye más en el desarrollo cuticular afectando la absorción de los herbicidas (HULL *et al.*, 1975). A altas temperaturas de crecimiento se observa en *C. erecta* una mayor cantidad de ceras depositadas en la superficie foliar (Figura 1 A y B). Las diferencias entre la cantidad de ceras depositadas a altas y bajas temperaturas es significativa. El aumento en la temperatura y baja humedad pueden inducir a un aumento en la síntesis de ceras y el consecuente aumento del carácter lipofílico de la superficie foliar (OLIVEIRA & BACCARIN, 2001 citado por MONQUERO *et al.*, 2005). Sin embargo, en otras especies se produce una disminución en la cantidad de ceras epicuticulares y variación en su composición al aumentar la temperatura (HATTERMAN-VALENTI *et al.*, 2006). Estos resultados contradictorios pueden estar relacionados con el hecho de existe una gran variabilidad temporal en la biosíntesis de ceras y se conoce muy poco sobre este proceso a diferentes estadios de desarrollo (NEINHUIS *et al.*, 2001). Se ha encontrado que mayoría de las especies son capaces de producir y hasta regenerar los cristales de cera durante la expansión permitiendo aumentar la protección de las hojas en este estadio considerado el más vulnerable (NEINHUIS *et al.*, 2001), en especies que presentan mayor contenido de ceras a baja temperatura de desarrollo, la baja tasa de expansión foliar sería la causante de este efecto (HATTERMAN-VALENTI *et al.*, 2006), sin embargo, no todas las plantas se comportan en forma similar existiendo especies que no sólo producen ceras durante la expansión sino que son capaces de hacerlo durante toda la vida de la hoja o ante estímulos específicos (NEINHUIS *et al.*, 2001).

La cantidad de ceras epicuticulares en *C. erecta* también varió entre los distintos estadios de desarrollo de la planta y aunque estas diferencias no fueron significativas, en las hojas de plantas adultas se observó una mayor cantidad de ceras epicuticulares (Figura 2 A y B). Es conocido el hecho de que la cantidad de cera aumenta a medida que la hoja madura (HULL *et al.*, 1975; FERREIRA *et al.*, 2005). Hojas jóvenes absorben más fácilmente determinados herbicidas dado que los depósitos de cera de la cutícula foliar de plantas jóvenes son menos profundos que los de plantas de más edad (GARCÍA TORRES & FERNÁNDEZ QUINTANILLA, 1991).

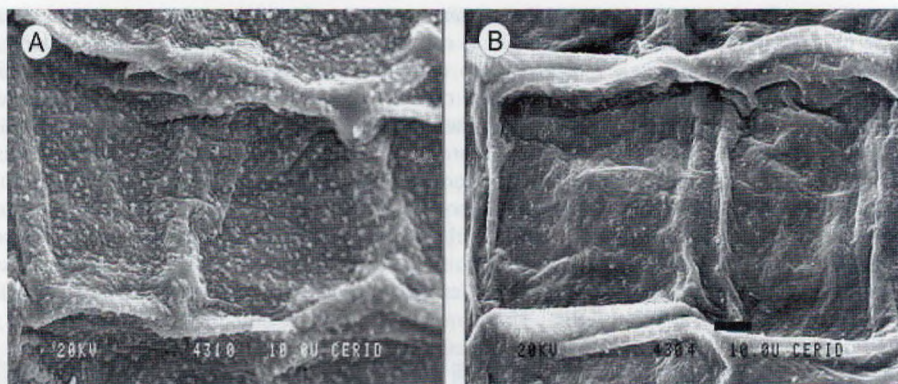


Figura 2: Variación en la cantidad y distribución de ceras. A, hojas de planta adulta (en floración); B, hojas de plántulas. Imágenes tomadas con MEB 1200x.

CONCLUSIONES

Variaciones en la temperatura de crecimiento y el estadio de desarrollo determinarían variaciones en el comportamiento de la especie a la aplicación del glifosato. A mayor temperatura y mayor edad menor efecto del mismo. Es necesario sin embargo, ahondar en estudios de absorción y traslocación para determinar el peso de esta variación encontrada en la cantidad en la respuesta final evaluando todos los factores que podrían estar involucrados en la respuesta.

BIBLIOGRAFIA

- BARTHLOTT, W.; NEINHUIS, C.; CUTLER, D.; DITSCH, F.; MEUSEL, I.; THEISEN, I. & WILHELMI, H. (1998). Classification and terminology of plant epicuticular waxes. *Bot. J. Linn. Soc.*, 126, 237-260.
- CHACHALIS, D.; REDDY, R.K. & ELMORE, E. (2001). Characterization of leaf surface, wax composition, and control of redvine and trumpet creeper with glyphosate. *Weed Science*, 49, 156-163.
- FERREIRA, E.A.; DEMUNER, A.J.; SILVA, A.A.; SANTOS, J.B.; VENTRELLA, M.C.; MARQUES, A.E. & PROCÓPIO, S.O. (2005). Composição química da cera epicuticular e caracterização da superfície foliar em genótipos de cana-de-açúcar. *Planta daninha*, 23, 611-619.
- GARCÍA TORRES, L. & FERNÁNDEZ QUINTANILLA, C. (1991). *Fundamentos sobre malas hierbas y herbicidas*. Ed. Mundi-Prensa. Madrid. 348 p.
- HATTERMAN-VALENTI, H.M.; PITY, A & OWEN, M. (2006). Effect of environment on giant foxtail (*Setaria faberi*) leaf wax and fluzifop-P absorption. *Weed Science*, 54, 607-614.
- HULL, H.M.; MORTON H.L. & WHARRIE, J.R. (1975). Environmental influences on cuticle development and resultant foliar penetration. *The Botanical Review*, 41, 421-452.
- MONQUERO, P. A. ; CHRISTOFFOLETI, P. J. ; AMIÁN, R. P. & OSUNA, M. D. (2004). Absorção, translocação e metabolismo do glyphosate por plantas tolerantes e suscetíveis. *Planta Daninha*, 22, 445-451.
- MONQUERO, P.A.; CURY, J.C. e CHRISTOFFOLETI, P.J. (2005). Controle pelo glyphosate e caracterização geral da superfície foliar de *Commelina benghalensis*, *Ipomoea hederifolia*, *Richardia brasiliensis* e *Galinsoga parviflora*. *Planta Daninha*, 23, 123-132.
- NEINHUIS, C.; Koch, K. & BARTHLOTT, W. (2001). Movement and regeneration of epicuticular waxes through plant cuticles. *Planta*, 213, 427-234.

- PANIGO, E. (2007). Variaciones de los Patrones Estructurales de *Commelina erecta* (Commelinaceae) por acción del glifosato. *Tesina de la Licenciatura en Biodiversidad*. Universidad Nacional del Litoral. 73p
- RAINERO, H. P. (2004). Avances en el control de malezas con tolerancia a glifosato. INTA. *EEA Manfredi, boletín* n°1, 5-12.
- SATICHIVI, N.; WAX, L.; STOLLER, E & BRISKIN, D. (2000). Absorption and translocation of glyphosate isopropanilamine and trimethylsulfonium salts in *Abutilon theophrasti* and *Setaria faberi*. *Weed Science*, 48, 675-679.
- SHARMA, S & SING, M. (2007). Effects of two surfactant series on the absorption and translocation of ¹⁴C-glyphosate in sicklepod and prickly sida. *Weed Biology and Management*, 7, 219-225.
- TUFFI SANTOS, L.D., MEIRA, R.M.S.A., SANTOS, I.C. e FERREIRA, F.A. (2004). Efeito do glyphosate sobre a morfoanatomia das folhas e do caule de *Commelina diffusa* e *C. benghalensis*. *Planta Daninha*, 22, 101-107.
- VITTA, J.; TUESCA, D. & PURICELLI, E. (2004). Widespread use of glyphosate tolerant soybean and weed community richness in Argentina. *Agriculture, Ecosystem and Environment*, 103, 621-624.

Summary. Influences of age and temperature during the cultivation of *Commelina erecta* on the epicuticular waxes quantity, distribution and glyphosate tolerance.

Tolerance to glyphosate varies depending on the developmental stage of plants in *Commelina erecta* L. Thus, control can be very well carried out in seedlings. The epicuticular waxes have been shown to be largely responsible for the cuticle barrier properties. Their amount and distribution varies with the age of the plant and can be modified by the environmental conditions. The objectives of this study were to examine changes in wax quantity and distribution leading to changes in glyphosate-tolerant *C. erecta*, by varying the temperature of cultivation and stage of development of the plant. Regrowth shoots and seedlings, one glyphosate concentration (1200 g. a.i. ha⁻¹) and two temperatures were used. Growth conditions in the growth room were 25/15 °C and 35/25 °C, day/night with a 14h photoperiod. Specific leaves were harvested for the studies of surface foliar and anatomy. There were not damages in adult plants treated for both temperatures neither in the seedlings grown in high temperatures. Seedlings at low temperature shows marked chlorosis correlated at anatomical level with a decrease in the number and coloration of the chloroplasts. At high temperatures a greater amount of waxes was observed, as much in adult plant as in seedlings, although that is smaller in second. A positive correlation would exist among age of the plant, temperature of growth and quantity of epicuticular waxes that would affect the degree of tolerance of this species.

Key words: Glyphosate-tolerant weeds, foliar anatomy, waxes, chlorosis