



ZTF-FCT
Zientzia eta Teknologia Fakultatea
Facultad de Ciencia y Tecnología

GRADO EN BIOLOGIA

TRABAJO DE FIN DE GRADO

**Efecto de la salinidad y el
herbicida glifosato en la
especie invasora *Baccharis
halimifolia***

Marina Ruiz Galarreta

Leioa, Julio 2014



eman ta zabal zazu

Universidad
del País Vasco

Euskal Herriko
Unibertsitatea

ÍNDICE

Resumen / Abstract	3
1. Introducción y objetivos	4
2. Materiales y métodos	
2.1. Especie de estudio: <i>Baccharis halimifolia</i>	7
2.2. Recolección en el campo	8
2.3. Trabajo en el invernadero	9
2.4. Trabajo en el laboratorio	11
2.4. Análisis estadístico	11
3. Resultados	
3.1. Caracterización de genotipos en el campo	13
3.2. Respuesta de <i>B. halimifolia</i> a la sal y al herbicida glifosato en condiciones controladas	
Biomasa	14
Acumulación de iones sodio	16
4. Discusión	18
5. Conclusión	21
6. Agradecimientos	22
7. Bibliografía	23

RESUMEN

La introducción de especies exóticas invasoras es una de las causas más importantes de pérdida de biodiversidad. *Baccharis halimifolia* es una de las 20 especies exóticas invasoras más perjudiciales en España e invade gran parte de la marisma de Urdaibai. En dicha marisma se aplicaron tratamientos de control mediante la corta y aplicación de herbicida (glifosato) tras los cuales se observó un variable porcentaje de rebrote en función de la salinidad edáfica. Se realizó un experimento en el que las plantas recolectadas en las parcelas tratadas fueron sometidas en el invernadero a un tratamiento de salinidad y a otro de glifosato con el fin de estudiar la interacción entre ambos tratamientos en individuos originados por germinación y por rebrote y las posibles diferencias entre sexos. Se estudiaron los parámetros de biomasa y acumulación de iones sodio. No se han observado diferencias significativas entre los sexos para ninguno de los parámetros. Sin embargo, los rebrotes acumulan más Na^+ que los individuos procedentes de germinación y su biomasa disminuye significativamente tras la aplicación de glifosato, únicamente en medio no salino. Nuestros resultados sugieren que los rebrotes de *B. halimifolia* reaccionan en mayor medida a la salinidad y al glifosato, lo que proporciona información de interés para la gestión.

ABSTRACT

The introduction of invasive exotic species is one of the most crucial causes of biodiversity loss. *Baccharis halimifolia* is one of the 20 most harmful invasive exotic species in Spain and it invades a huge area of the Urdaibai marsh. Control treatments have been conducted in this marsh through cutting and glyphosate application. Variable levels of resprouting were observed after treatment related with heterogeneous edaphic salinity. In this research plants collected in treated areas were subjected to salinity and herbicide in the greenhouse in order to study the interaction between both treatments in individuals originated from germination and from resprout and the possible differences between sexes. The parameters studied were the total biomass and the accumulation of sodium ions. There were no significant differences between sexes in any case. However, resprouts accumulated more Na^+ than individuals originated from germination. A significant biomass decrease by glyphosate application has been detected in individuals regenerated by resprout in non saline treatment. In conclusion, our results suggest that *B. halimifolia* resprouts might be more sensitive to salinity and glyphosate, which contributes important information for management purposes.

1. Introducción y objetivos

Las invasiones biológicas, junto con la destrucción del hábitat, suponen un factor de riesgo muy significativo y de gran impacto en la biodiversidad global y conservación de los ecosistemas (**Mack et al., 2000**). La amenaza que suponen estas invasiones en la biodiversidad está reconocida como uno de los problemas más serios a nivel mundial (Evaluación de los Ecosistemas del Milenio, 2005) y conlleva un gasto económico enorme estimado en 12 billones de euros al año en Europa (**Agencia Europea del Medioambiente EEA, 2012**). El conocimiento en este campo ha ido avanzando durante estos últimos años. De igual modo, el número de proyectos destinados a erradicar estas plantas exóticas invasoras y a recuperar el ecosistema nativo ha ido en aumento.

Las plantas invasoras son plantas naturalizadas, capaces de establecerse y reproducirse a largas distancias de los parentales en un nuevo ecosistema adaptándose a condiciones bióticas y abióticas diversas (**Richardson, 2000**) y capaces de alterar el hábitat nativo, pudiendo ocasionar, como se ha mencionado anteriormente, pérdidas económicas (**Vilá et al., 2008**). No todas las plantas introducidas son invasoras. Se ha estimado que 1 de cada 1000 especies introducidas llegan a convertirse en invasoras (**Williamson & Fitter, 1996**). Se caracterizan por presentar eficientes mecanismos de colonización y dispersión como son una gran capacidad adaptación a su nuevo nicho ecológico, una alta producción de semillas y una tasa de crecimiento elevada.

Baccharis halimifolia es un ejemplo claro de planta invasora. Originaria de la costa atlántica del sur de Norteamérica, se introdujo en Europa con fines ornamentales en el año 1783 en el Jardín Botánico de París, pero no fue considerada especie naturalizada hasta 1906 (**Caño et al., 2013a**). En pocas décadas, consiguió invadir zonas naturales, especialmente en hábitat costeros, convirtiéndose así en una de las invasiones biológicas de mayor gravedad en las costas europeas (**Caño et al., 2013a**). Es capaz de desplazar y sustituir la vegetación autóctona de marismas y acantilados, crear zonas monoespecíficas y podría llegar a modificar el suelo. En las marismas, la salinidad es uno de los factores ecológicos más importantes que determina la distribución de las especies respecto a la altitud (**Banerjee, 1993**) y la distancia al mar

(Wilson et al., 1996). Por ello, una de las características que le confiere un gran potencial invasor en estos habitats es su resistencia y tolerancia a un amplio rango de salinidad e inundación (Westman et al., 1975; Caño et al., 2013a,b, 2014). Dicha tolerancia se basa en una gran plasticidad y variabilidad intraespecífica lo que facilita su desarrollo en ambientes muy diversos y heterogéneos (Caño et al., 2014). Estudios anteriores muestran que *B. halimifolia* tolera un rango de salinidad de entre 10 g·L⁻¹ (171 mM) y 15 g·L⁻¹ (257 mM) sin sufrir demasiados daños externos, pero a partir de 15 g·L⁻¹ se evidencia un incremento de mortalidad y de daños a nivel vegetativo (Tens, 2010). También se muestra que esta especie acumula iones sodio (Na⁺) en sus hojas, tallos y raíces para hacer frente al estrés osmótico (Caño et al., 2011). Sin embargo, aún no se conoce si existen diferencias entre individuos femeninos y masculinos en las respuestas a la salinidad.

La mayor extensión invadida por *B. halimifolia* en España se encuentra en la Reserva de la Biosfera de Urdaibai (UNESCO, 1989). Según la cartografía de 2005, la invasión afectaba a unas 288 ha, de las cuales, 88 ha eran formaciones monoespecíficas. *B. halimifolia* invade gran parte de la marisma (Prieto, 2006), especialmente comunidades subhalófilas, como juncales de *Juncus maritimus* o praderas de *Elymus pycnanthus*. Estas comunidades son de gran importancia para la conservación de la biodiversidad y constituyen el hábitat 1330 de la Directiva de Hábitats (Directiva 92/43/CEE). Dada la gravedad de la invasión, desde 2001 el Gobierno Vasco ha desarrollado una serie de acciones y trabajos con el fin de intentar controlar y eliminar esta especie en Urdaibai. En el año 2010 se puso en marcha el proyecto “Restauración de hábitat de interés comunitario en estuarios del País Vasco” (LIFE08NAT/E/000055) promovido por el Departamento de Medio Ambiente del Gobierno Vasco, con la financiación de la Comisión Europea mediante el programa LIFE+ y la colaboración de la Sociedad Pública de Gestión Ambiental Ihoibe. Además de Urdaibai, los estuarios del río Lea en Vizcaya y Txingudi en Guipúzcoa (Red Natura 2000, Zonas especiales de conservación ZEC) también fueron incluidos. La primera campaña de eliminación se realizó en 2011 y se centró exclusivamente en Urdaibai. Utilizaron el herbicida glifosato como método de erradicación por su eficacia y su capacidad para biodegradarse (González-Moro et al., 1993).

Los resultados del proyecto LIFE+ indican que el 60% de los individuos tratados se han eliminado. Sin embargo, los resultados fueron variables en función de las condiciones ambientales de la parcela tratada (**Beteta et al., 2012**). En zonas más elevadas y en parcelas donde no hay apenas influencia mareal, hay entre un 40% y 75% de rebrote, llegando incluso al 100%. Sin embargo, en la zona de influencia mareal el porcentaje de rebrote era muy bajo, de 0% a 10%, lo que indica que la salinidad e inundación pueden favorecer a la eliminación de esta especie. Estos resultados sugieren además que puede existir una interacción entre los efectos causados por la salinidad y los causados por el herbicida. Por todo ello, la base de este estudio es determinar cómo afecta la salinidad y la aplicación de herbicida a la supervivencia y crecimiento (fitness) de esta especie invasora con el fin de encontrar métodos de control más eficientes en este tipo de ecosistema.

Para ello se realizó un experimento en invernadero en el que las plantas fueron sometidas a un tratamiento de salinidad y otro de herbicida. Con el fin de incorporar al estudio las diferencias entre individuos femeninos y masculinos, se utilizaron esquejes (en lugar de semillas) de individuos recolectados en el campo, donde se pudo diferenciar el sexo del individuo. Debido a que las respuestas fisiológicas pueden diferir entre plantas procedentes de rebrote o de semillas, para el experimento se recolectaron tanto rebrotes originados tras la aplicación de herbicida por el proyecto LIFE+ como germinaciones posteriores al tratamiento. Además, dada la variabilidad intraespecífica de esta especie, se incluyeron en el experimento individuos recolectados tanto en ambientes halófilos como no halófilos y así obtener una variabilidad mayor.

Por lo tanto, los objetivos de este estudio son:

- Determinar cómo varía la respuesta a la sal dentro de una misma población de *B. halimifolia* en función del sexo y del hecho de que proceda de un rebrote o de germinación.
- Determinar la respuesta de *B. halimifolia* a la aplicación de glifosato.
- Determinar el efecto combinado del tratamiento de sal y el tratamiento de herbicida, es decir, la interacción entre ellos sobre el crecimiento de *B. halimifolia*.

2.- MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. Especie de estudio: *Baccharis halimifolia*.

Baccharis halimifolia L. es un arbusto dioico de la familia Asteraceae. Es originaria de la costa atlántica del Sur de Norteamérica y se introdujo en Europa con fines ornamentales. Tanto en su región de origen como en Europa es común en zonas costeras y marismas y se sitúa en lugares de salinidad media (**Young 1994, Tolliver et al., 1997, Caño et al., 2013a**). En Europa se está extendiendo por el sureste de Francia y por la cornisa cantábrica de España (**Caño et al., 2013a**). Se citó por primera vez en la Península Ibérica en Lekeitio, Vizcaya (**Allorge, 1941**). *B. halimifolia* está considerada una de las 20 especies exóticas invasoras más perjudiciales en España (**GEIB 2006**) y puede considerarse una planta transformadora (**Campos, 2010**), es decir, que además de sustituir otras especies, provoca cambios en las características propias del ecosistema invadido (**Richardson et al., 2000**).

B. halimifolia puede alcanzar los 3 metros de altura y vivir hasta 15 años. En nuestro territorio se comporta como semidecíduo, es decir, dependiendo del ambiente sus hojas son caducas o perennes, y el crecimiento vegetativo tiene lugar principalmente durante la primavera y el verano (**Caño et al., 2013b**). La floración tiene lugar a principios de septiembre. Los individuos masculinos tienden a florecer antes que los individuos femeninos y la dispersión de frutos se da a finales del mes de octubre (**Caño et al., 2013b**). El éxito de invasión de *B. halimifolia* se debe en parte a su gran potencial colonizador y pionero. El número de semillas por planta femenina se encuentra en un intervalo entre 10.000 y 1.500.000 (**Westman et al., 1975**) en condiciones de luz idóneas. Son pequeñas semillas bien adheridas al vilano, de fácil dispersión por el viento, entre 2 y 3 millas, y posterior germinación (**Panetta, 1979**). Posee gran tolerancia y resistencia a cambios de salinidad, inundaciones y desecaciones además de tener gran capacidad de rebrote tras ser quemada o cortada (**Westman et al., 1975; Campos, 2010; Caño et al., 2013b**)

2.2. Recolección en el campo.

En el experimento realizado en invernadero se utilizaron esquejes de plantas (consideradas como “plantas madre”) recolectadas en el estuario de Urdaibai, ubicado en la desembocadura del río Oka en el mar Cantábrico. Este lugar está caracterizado por un clima húmedo y mesotérmico, donde se encuentra una gran variedad de hábitat de interés para la conservación, en especial, las marismas.

En esta área se realizaron en 2011 tratamientos de control en el marco del proyecto LIFE+ del Gobierno Vasco que consistieron en la tala y aplicación de glifosato en tocón. Tras el tratamiento, algunos rebrotaron mientras que nuevos individuos crecieron a partir de la germinación de semillas presentes en el suelo. Por ello, todos los individuos recolectados tenían 2 años de edad. En total, se recolectaron un conjunto de 42 genotipos originados por germinación y 16 genotipos originados por rebrote. Estos genotipos, a su vez, se diferenciaban en sexo masculino o femenino. El muestreo se llevó a cabo al azar, recolectando genotipos situados a más de 100 metros, tanto en zonas halófilas como subhalófilas. Se caracterizó el ambiente donde se recolectó cada genotipo atendiendo a la composición florística. Se identificaron las especies acompañantes de *B. halimifolia* en cada punto de muestreo. Para cada genotipo se estableció si su ambiente era halófilo o no halófilo en función de dicha composición florística, es decir, en relación a la presencia o ausencia de especies halófilas (Herrera, 1995; Caño et al 2014). Siempre que fue posible se recolectaron parejas de individuos en cada punto de muestro, uno femenino y otro masculino, con el fin de comparar el estatus fisiológico entre ambos sexos cuando las condiciones edáficas eran similares. Lo mismo se intentó llevar a cabo con el tipo de regeneración. Con el fin de realizar la caracterización fisiológica de los individuos en campo, de cada genotipo, además, se recolectaron 4 hojas que fueron secadas en la estufa del laboratorio del Departamento de Biología Celular Vegetal y Ecología de la UPV-EHU para el posterior análisis de su contenido en iones sodio (Na^+). Estudios previos demuestran que el contenido en Na^+ de las hojas está correlacionado con la salinidad del suelo en la marisma (Caño et al., 2011) y que es un buen indicador del estatus fisiológico de las plantas.

2.3. Trabajo en el invernadero.

Puesta en marcha del experimento

Para determinar la respuesta de *B. halimifolia* a la sal y a la aplicación de herbicida, se efectuó un ensayo de crecimiento en condiciones controladas en un invernadero de los Servicios Generales de Investigación de la Universidad del País Vasco (SGIKER). Se utilizaron esquejes como puesta de cultivo. Se obtuvieron 16 esquejes de cada uno de los 58 genotipos recolectados en el campo para el estudio. Se plantaron aleatoriamente en bandejas de 12 alvéolos utilizando un sustrato de perlita y vermiculita debido a las características de retención de humedad, porosidad, leve peso y neutralidad que conlleva este sustrato. Cada bandeja de alvéolos se colocó en una bandeja, compartiendo todos los individuos de una misma bandeja el mismo tratamiento. Las bandejas se marcaron con distintos colores para facilitar el riego. El riego se llevó a cabo en todo momento con agua desionizada y con solución nutritiva Hoagland (**Hoagland & Arnon, 1933**). Tanto las disoluciones salinas para el riego como la elaboración de la solución nutritiva Hoagland, sin y con sal, se realizaron en el laboratorio del fitotrón de los servicios generales de la UPV-EHU (SGIKER). Una vez por semana se aleatorizaba la posición de las bandejas en el invernadero para evitar posibles efectos sistemáticos sobre las plantas causados por la heterogeneidad de las condiciones en el interior del mismo.

Debido a la alta mortalidad de los esquejes, finalmente se incluyeron sólo 49 genotipos en el experimento y por cada genotipo de 4 a 12 esquejes de tamaños similares. La mitad de los esquejes de un genotipo (de 2 a 6) se tratarían con sal y la otra mitad sin sal. El experimento en total incluyó 443 plantas.

Tratamiento de salinidad

El tratamiento de salinidad se aplicó una vez que las plantas estuvieron establecidas en el invernadero. Se utilizó como criterio de establecimiento la producción de nuevas hojas por parte de los esquejes en el invernadero. Antes de empezar con el tratamiento, se contó el número de hojas y se midió la altura para conocer el tamaño inicial de cada individuo, dado que la variabilidad entre ellos era notoria. El tratamiento de salinidad incluyó dos niveles: control (agua destilada, 0 mM de NaCl) y solución salina con cloruro sódico (NaCl) 200 mM. La primera aplicación del

tratamiento tuvo lugar el día 7 de enero. Inicialmente se aplicó una solución salina 100 mM para permitir la aclimatación de las plantas. A partir de la primera semana, la mitad de los individuos fueron regados 3 veces a la semana con 40 ml de agua desionizada cada día mientras que la otra mitad serían regados con 40 ml agua desionizada con una concentración de NaCl 200 mM hasta el final del experimento. Se utilizó la solución nutritiva Hoagland (Hoagland & Arnon, 1933) para aportarles los nutrientes necesarios para su crecimiento una vez por semana. En el caso de los individuos que crecían con sal, se utilizó Hoagland NaCl 200mM.

Una vez pasadas 7 semanas se midió el número de hojas, el diámetro y el estado de floración de todos los individuos para conocer el tamaño de cada uno de ellos antes de aplicarles el herbicida glifosato. Se recolectaron a su vez 4 hojas de cada individuo, intentando no perjudicar en gran medida a la planta, con el fin de conocer la concentración de Na⁺ y K⁺ presente en las hojas. Todas las hojas se recolectaron del segundo tercio superior de la planta.

Tratamiento de herbicida

El herbicida utilizado fue el glifosato debido a que es el único herbicida cuya aplicación está autorizada en los hábitat invadidos por *B. halimifolia* y el que fue empleado en el proyecto LIFE+ mencionado. El glifosato parece resultar adecuado debido a su capacidad para biodegradarse, su bajo nivel de toxicidad y su eficacia. Es un herbicida sistémico que inhibe la síntesis de aminoácidos aromáticos (González-Moro et al., 1993), causando así la muerte de la planta. El día 1 de marzo (semana 7 de crecimiento) se aplicó glifosato 9 mM sobre la mitad de los individuos control y la mitad de los individuos que crecían con sal. Se obtuvo como consecuencia la siguiente interacción entre los tratamientos (Tabla 1):

Tabla 1. Interacción entre el tratamiento de salinidad y el tratamiento del herbicida glifosato.

		HERBICIDA GLIFOSATO	
		Control	GLIFOSATO 9 mM
SALINIDAD	Control	NO SAL- NO GLIF (1 a 3 esquejes por genotipo)	NO SAL- GLIF (1 a 3 esquejes por genotipo)
	SAL 200 mM	SAL- NO GLIF (1 a 3 esquejes por genotipo)	SAL-GLIF (1 a 3 esquejes por genotipo)

A los 10 días de la aplicación del glifosato, se volvió a contar el número de hojas y se midió la altura por planta para estimar el tamaño final. Se realizó la cosecha.

2.4. Trabajo de laboratorio.

Secado del material

Todo el material recogido se secó a 70° C en las estufas del laboratorio del Departamento de Biología Celular Vegetal y Ecología de la UPV-EHU, donde se llevaría a cabo el resto del experimento. Una vez seco se pesó para estimar la biomasa total.

Digestión ácida

Se utilizó una submuestra de 90 individuos de los cuáles la mayoría eran individuos crecidos en sal (39) y unos pocos control (8), con el fin de poder hacer una posterior comparación. El resto de individuos eran plantas madre (42). Con las hojas recogidas de estos individuos en el invernadero previamente al tratamiento con glifosato y con las hojas recogidas en las plantas madre en el campo, se realizaron una serie de digestiones para conocer la acumulación de Na⁺ y K⁺ en los distintos individuos. Las hojas (material seco) fueron molidas en un mortero (Retsch Lab equipment) para su posterior digestión ácida. De cada individuo recolectado en el laboratorio se obtuvo un mínimo de 60mg de muestra y de cada planta madre 200mg ya que su tamaño de muestra recolectada era mayor. El tamaño de la muestra no era relevante según indicó el Servicio Central de Análisis SGIKER ya que la concentración de Na⁺ esperada era muy alta y sensible al espectroscopio independientemente del tamaño de la muestra. Las muestras fueron digeridas con una combinación de HNO₃/HClO₄ según **Bastías et al. (2004)**. El contenido de Na⁺ y K⁺ fue determinado mediante espectroscopia de absorción atómica (Spectra AA-250 plus, VARIAN Inc., USA) y se llevó a cabo por el Servicio Central de Análisis SGIKER.

2.5. Análisis estadístico.

Las comparaciones entre factores se llevaron a cabo con dos análisis de la varianza (ANOVA) utilizando la versión 20 del programa informático SSPS (**IBM Corp. 2011**). El nivel de significación para ambos análisis fue P≤0,05. Antes de realizar el análisis se calculó la media de todas las variables por genotipo utilizando el número de

esquejes por genotipo que crecía en cada combinación de tratamientos (de 1 a 3). En el primer análisis, se tomó como variable dependiente la biomasa total y como factores fijos, el sexo, el tipo de regeneración (germinación vs. rebrote), el tratamiento de sal y el tratamiento de herbicida. Se tomó el número de hojas previo al tratamiento de sal como indicador del tamaño inicial y se incorporó al análisis como covariable. En el segundo análisis, se tomó como variable dependiente el Na^+ acumulado en las hojas de los individuos tratados con sal y como factores fijos, el sexo y el tipo de germinación. Se tuvo en cuenta de nuevo la covariable utilizada en el primer análisis, número de hojas previo al tratamiento con sal. El tamaño inicial se incluyó como covariable en ambos análisis ya que era muy variable entre genotipos y en nuestra opinión, puede influir de manera notable tanto en la biomasa final como en la acumulación de Na^+ .

3.- Resultados

3.1. Caracterización de los genotipos del campo

La espectroscopia de absorción atómica de 50 genotipos recolectados en el campo, realizada con el fin de conocer la acumulación de Na^+ de las líneas maternas, dio como resultado un rango de concentración de Na^+ en hojas de entre $12 \text{ mg Na}^+ \cdot \text{g}^{-1}$ de hoja $^{-1}$ y $44 \text{ mg Na}^+ \cdot \text{g}^{-1}$ (Fig. 1).

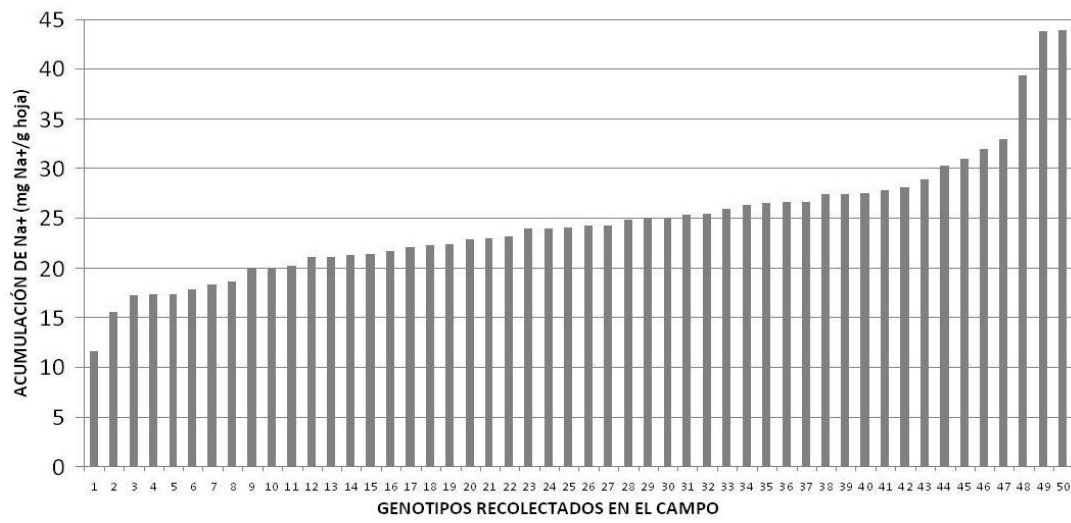


Figura 1. Rango de acumulación de Na^+ en individuos recolectados en el campo.

Se observa que los genotipos que consideramos que crecían en una comunidad halófila efectivamente acumulan más Na^+ que los genotipos que fueron recolectados en sitios considerados como no halófilos (Fig.2). Esto indica que las comunidades de plantas pueden ser indicadoras de las condiciones de suelo y del estatus fisiológico de *B. halimifolia*.

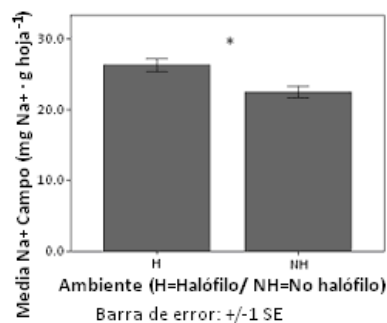


Figura 2. Media de la concentración de Na^+ en hoja ($\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$) de los individuos recolectados en ambiente halófilo y no halófilo. *Análisis estadístico de la varianza (ANOVA) significativo, $p < 0,05$.

En 23 puntos de muestreo se encontraron y recolectaron parejas de individuos, uno femenino y otro masculino. Esto permitió comparar el estatus fisiológico entre ambos sexos cuando crecen en condiciones edáficas iguales. Se observa que no existen diferencias entre los sexos en cuanto a la acumulación de Na^+ en un mismo sitio y ambiente de crecimiento (**Fig. 3**). Por lo tanto, el sexo no parece influir en la acumulación de Na^+ en el campo.

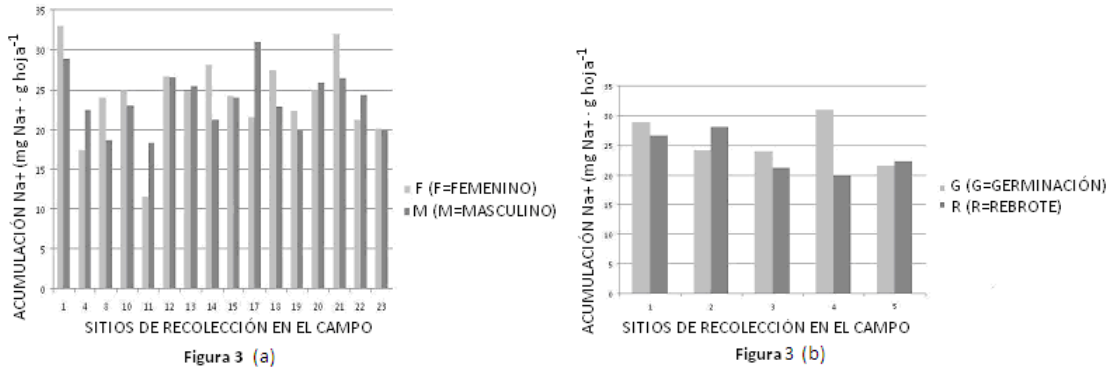


Figura 3. Acumulación de Na^+ ($\text{mg Na}^+ \cdot \text{g}^{-1}$ hoja) por parejas de individuos masculino y femenino por cada sitio de recolección (a) y por parejas de individuos de germinación y rebrote (b).

En 5 puntos de muestreo se encontraron parejas de individuos de germinación y rebrote. Esto permitió de nuevo comparar el estatus fisiológico entre ambos tipos de regeneración cuando crecen en condiciones edáficas iguales. No se aprecian diferencias entre ellos (**Fig.4**). Esto parece indicar que el tipo de regeneración no influye en la acumulación de Na^+ .

3.2. Respuestas de *B. halimifolia* a la sal y al herbicida glifosato en condiciones controladas.

Biomasa

El análisis estadístico ANOVA indica que el tamaño inicial de cada individuo influye sobre la producción de biomasa al final del experimento. La biomasa no difiere significativamente en general entre los sexos masculino y femenino (**Tabla 2**). Además, tampoco se observaron diferencias significativas en la interacción del factor sexo con el resto de factores (glifosato, tipo de regeneración). Es por esto que dichas interacciones no fueron incluidas en el modelo final. Ello indica que el crecimiento tampoco difirió entre sexos en función del tratamiento.

Tabla 2. Análisis de la varianza (ANOVA) para la biomasa total.

Variable dependiente: BIOMASA TOTAL			
FACTOR	gl	F	Sig.
TAMAÑO INICIAL	1	56.413	.000
SAL	1	82.170	.000
GLIFOSATO	1	8.345	.004
TIPO	1	.455	.501
SEXO	1	.115	.735
TIPO * SAL	1	.831	.363
TIPO * GLIFOSATO	1	4.286	.040
SAL * GLIFOSATO	1	5.331	.022
TIPO * SAL * GLIFOSATO	1	5.442	.021
Error	170		

El estadístico, además indica que el tipo de regeneración (germinación o rebrote) tampoco afecta de manera general significativamente la biomasa y por tanto el crecimiento en invernadero (**Tabla 2**). Sin embargo, el efecto de la interacción entre la salinidad, el tratamiento con herbicida y la regeneración sí es significativo (**Tabla 2**). Se observa que en presencia de sal, tanto en germinación (**Fig. 5a**) como en rebrote (**Fig. 5b**), la biomasa producida es mucho menor que en ausencia de sal y no se detectó efecto del glifosato en el crecimiento. En cambio, en los individuos control, aunque no se detectó efecto del glifosato en las plantas que procedían de germinación, sí se detectó una disminución significativa de la biomasa en los individuos regenerados por rebrote cuando se les aplicó glifosato 9 mM (**Fig. 5b**).

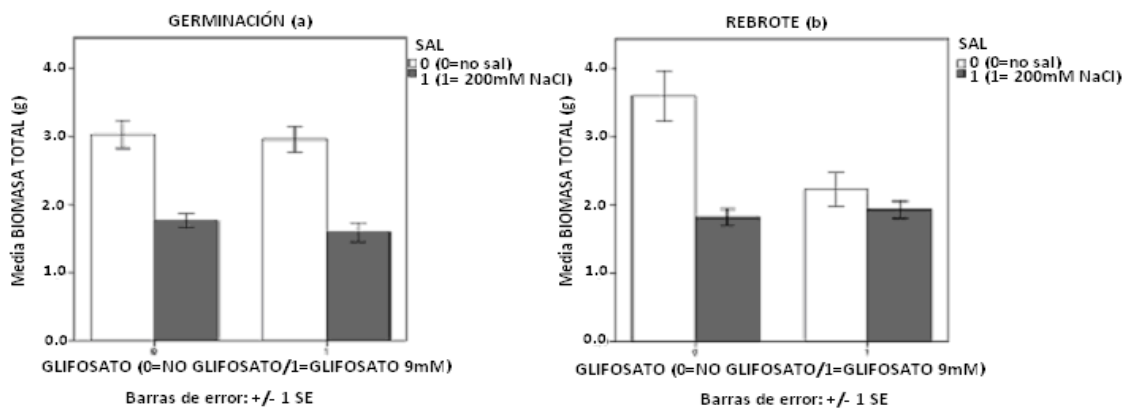


Figura 5. Datos de biomasa total observados en la interacción entre los factores de salinidad y glifosato en germinación (a) y rebrote (b). En este gráfico no se tiene en cuenta el efecto del tamaño inicial sobre

la biomasa final, que es estadísticamente significativo. Más detalles sobre efectos significativos en tabla 2.

Acumulación de Na⁺ en hojas

Los individuos del experimento crecieron en ambientes salino y no salino. Tras la espectroscopia de absorción atómica se pudo conocer la concentración de sodio que tenían 90 de nuestros individuos dentro de los cuales se encontraban individuos representativos de todos los genotipos que crecían en sal (dar cifra) y una submuestra de individuos correspondientes a genotipos al azar que crecían sin sal. Como se puede observar, la concentración de Na⁺ de aquellos que crecieron en una solución salina 200mM es mayor que en los individuos control (**Fig.6**). La concentración de Na⁺ de estos últimos se debe a que la solución nutritiva llevaba sodio.

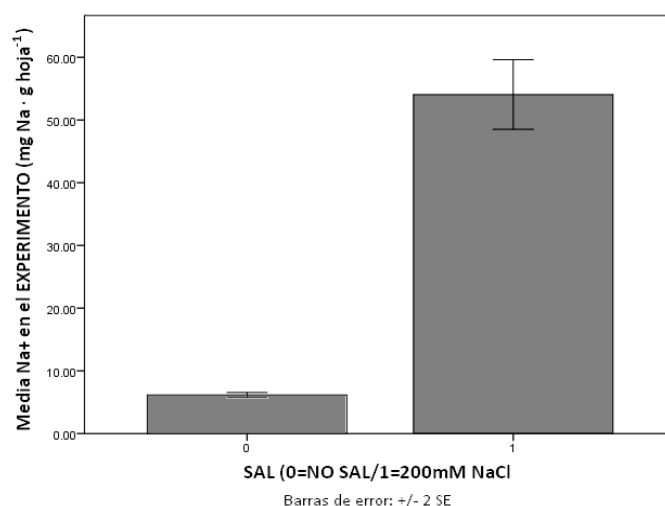


Figura 6. Datos observados de acumulación de Na⁺ en hoja (mg Na⁺ · g⁻¹ hoja) en el tratamiento de salinidad.

El tipo de regeneración influye en la cantidad de Na⁺ que acumulan los individuos del experimento (**Tabla 3**), junto con el tamaño inicial de cada individuo. Los rebrotes acumulan más Na⁺ que los individuos procedentes de germinación (**Fig. 7**). Se puede observar que los individuos masculinos de rebrote tienden a acumular más Na⁺ que los individuos femeninos de rebrote. A su vez, los individuos femeninos de germinación tienden a acumular más Na⁺ que los masculinos del mismo tipo de regeneración. Sin embargo, ni el sexo ni su interacción con el tipo de regeneración

aparece significativo en el análisis ANOVA por lo que esta tendencia no es estadísticamente significativa.

Tabla 3. Análisis estadístico de la varianza (ANOVA) para la acumulación de Na⁺ en las hojas en el experimento.

Variable dependiente: Na ⁺ acumulado en las hojas en el EXPERIMENTO			
FACTOR	gl	F	Sig.
TAMAÑO INICIAL	1	11.559	.002
TIPO	1	5.941	.020
SEXO	1	.556	.461
Error	33		

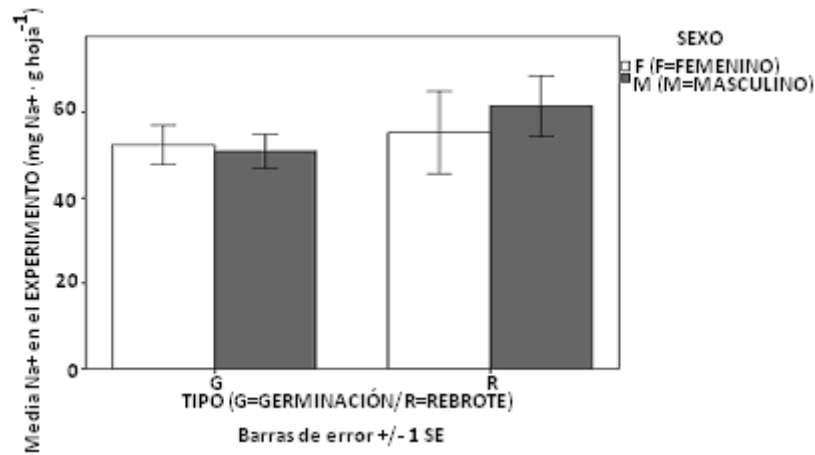


Figura 7. Datos observados de la acumulación de Na⁺ (mg Na⁺ · g⁻¹ hoja) en individuos masculinos y femeninos originados por rebrote y por germinación. En este gráfico no se tiene en cuenta la influencia del tamaño inicial, estadísticamente significativo en la acumulación de Na⁺.

4.- Discusión

El rango de acumulación de Na⁺ en el campo se encuentra entre 12 mg Na⁺/g hoja y 44 mg Na⁺/g hoja. Sin embargo, en el experimento, se puede observar una acumulación media de 55 mg Na⁺/g hoja en los individuos que crecieron en un tratamiento salino continuado de 200 mM. Esta mayor acumulación de Na⁺ puede deberse a distintos factores como el tamaño y la edad. Se ha observado que el tamaño influye de manera muy significativa en la acumulación de Na⁺, individuos de mayor tamaño acumularían más. Además, las condiciones en el invernadero y el riego con una solución NaCl 200mM pueden hacer variar el contenido de Na⁺ habitual de *B. halimifolia*. La lluvia, a su vez, puede hacer disminuir ésta concentración en el campo y no permitir saber con claridad la acumulación media en el campo.

Se observa que los genotipos que consideramos que crecían en una comunidad halófila efectivamente acumulan más Na⁺ que los genotipos que fueron recolectados en sitios considerados como no halófilos. Por lo tanto, la presencia/ausencia de especies como *Aster tripolium*, *Aster squamatus*, *Atriplex pruinosa* y *Festuca pruinosa*, especies que consideramos propias de un ambiente halófilo (Herrera, 1995), puede ser un buen indicador de las condiciones del suelo y de estatus fisiológico de *B. halimifolia*. En juncuales con plantas halófilas, los valores de salinidad del suelo son superiores y el crecimiento de *B. halimifolia* inferior que en los juncuales donde las halófilas están ausentes (Caño et al., 2013b, 2014).

Según nuestro experimento, la producción de biomasa se reduce hasta un máximo del 50% cuando las plantas son sometidas a una salinidad de 200mM. Esta concentración salina equivale a la concentración media encontrada en el campo (Caño et al., 2014). En estudios previos también se ha podido constatar que concentraciones similares de sal reducen el crecimiento de *B. halimifolia* tanto en el campo (Caño et al., 2013b, 2014) como en condiciones controladas (Tolliver et al., 1997; Tens, 2010; Caño et al., 2011;)

En este estudio no hemos encontrado diferencias significativas entre sexos ni el crecimiento ni en la acumulación de Na⁺ lo que nos lleva a pensar que el sexo del individuo no es condicionante para estas dos variables de respuesta a la salinidad. Sin embargo, Krischik & Denno (1990) determinaron que los individuos masculinos tenían

una mayor tasa de crecimiento que los individuos femeninos en condiciones de salinidad intermedia. Ello puede deberse a que ellos trabajaron con semillas y nosotros con esquejes. Esta distinción en el método puede atenuar posibles diferencias entre sexos. Pueden darse, por ejemplo, diferencias de crecimiento al cabo de más o menos meses o a concentraciones de sal distintas.

A su vez, tampoco hemos encontrado diferencias significativas entre germinaciones y rebrotes en el campo en cuanto a acumulación de Na^+ , lo que puede ser debido al pequeño número de sitios muestreados (5 en este caso) o bien a que las parejas germinación-rebrote elegidas también diferían en tamaño. Precisamente se observa que el tamaño tiene un efecto sobre la acumulación de Na^+ como se ha mencionado anteriormente. Se observa que, teniendo en cuenta siempre el tamaño inicial de cada individuo en el invernadero, sí se observan diferencias entre rebrotes y germinaciones. Las plantas que procedían de rebrotes acumulan más Na^+ y reaccionan en mayor medida al glifosato que las plantas que procedían de germinaciones.

Las diferencias obtenidas en el comportamiento de los rebrotes vs germinaciones podrían tener interés a la hora de aplicar las medidas de control en campo. Así, las respuestas al tratamiento llevado a cabo por el proyecto LIFE+ podían ser dos. Por un lado, la aplicación de herbicida en el campo podía originar rebrotes más fuertes y tolerantes y reforzar a la invasora en cierto modo. Por el contrario, al tratarlos, los individuos que rebrotan podían debilitarse, lo que indicaría que el tratamiento aplicado favorece paulatinamente la erradicación de *B. halimifolia*. Los resultados del proyecto LIFE indican que el índice de rebrote es mayor en lugares donde hay poca influencia mareal y en zonas de mayor altitud, es decir, en ambientes no halófilos. Nuestro trabajo apoya estos resultados.

Se observa que en presencia de sal, tanto la biomasa total de las germinaciones como de los rebrotes disminuye considerablemente y la aplicación de glifosato no les perjudica prácticamente. Esto puede deberse a que el individuo ya está muy dañado por la sal. Alternativamente, podría ocurrir que el tiempo transcurrido desde la aplicación del glifosato fue insuficiente para detectar efectos en el crecimiento en plantas que crecían en sal. Por otro lado, estudios paralelos indican que la acumulación de shikimato (indicador bioquímico del daño causado por el glifosato) es menor en plantas sometidas a sal que en plantas control (López, datos no

publicados) lo que parece también indicar que las plantas que crecen en sal podrían ser menos sensibles al glifosato. En cambio, en los individuos control, aunque no se detectó efecto del glifosato en las plantas que procedían de germinación, sí se detectó una disminución significativa de la biomasa en los individuos regenerados por rebrote cuando se les aplicó glifosato. Esto puede indicar que los rebrotes en condiciones idóneas pueden presentar un crecimiento más vigoroso pero, una vez aplicado el glifosato se ven más debilitados que las plantas originadas por germinación. Además, López (datos no publicados) encontró que los individuos que procedían de rebrotes acumulaban más shikimato en ausencia de salinidad, lo que parece corroborar nuestros resultados. Nuestros resultados s podrían ayudar a renovar la gestión del proyecto y plantear un nuevo tratamiento de glifosato en las zonas dónde la salinidad es nula y de este modo, dar un paso adelante en la eliminación de esta especie invasora.

5.- CONCLUSIONES

1. La sal limita el crecimiento de *B. halimifolia*.
2. *B. halimifolia* acumula Na^+ en condiciones de salinidad y esta respuesta es muy variable en el campo lo que indica una gran plasticidad en esta especie.
3. No hay diferencias de crecimiento y acumulación de sodio estadísticamente significativas entre individuos masculinos y femeninos en una población de *B. halimifolia*.
4. Los individuos originados por rebrote acumulan más Na^+ y reaccionan en mayor medida al glifosato que los originados por germinación.
5. Las comunidades de plantas son indicadoras de las condiciones del suelo y del status fisiológico de *B. halimifolia*.

6.- AGRADECIMIENTOS

Quisiera agradecer a todos los compañeros del Laboratorio de Investigación del Departamento de Biología Vegetal y Ecología, muy especialmente a mi directora del Trabajo de Fin de Grado, la Dra. Lidia Caño Pérez, por su afán por enseñarme e integrarme en el mundo de la investigación, ayudarme y aconsejarme en todo momento durante la realización de este trabajo; y a la Dra. M^a Begoña González Moro. Así mismo me gustaría dar las gracias a:

- La alumna de Master Sara López Fernández, por su colaboración en este estudio.
- Dra. Teresa Fuertes Mendizábal, por su colaboración y ayuda en las técnicas de laboratorio.
- Todo el equipo del Laboratorio de Biología Vegetal y Ecología y los alumnos en prácticas, por su ayuda en momentos puntuales de intenso trabajo.
- A la Dra. Azucena González y al servicio Fitotrón e Invernadero SGIKER UPV/EHU por el apoyo técnico.
- Al servicio central de Análisis SGIKER UPV/EHU por el apoyo técnico.

7.- BIBLIOGRAFÍA

Allorge, P. & Allorge, V. (1941). Les ravins à fougères de la corniche vasco-cantabrique. Bulletin de la Société Botanique de la France, **88**: 92-111.

Banerjee, LK. (1993). Influence of salinity on mangrove zonation. In: Lieth H and Al Masoom A (eds) Towards the Rational Use of High Salinity Tolerant Plants, Vol 1, pp 181–186.

Bastias, E.I., Gonzalez-Moro, M.B., Gonzalez-Murua, C., (2004). Zea mays L. amylacea from the Llutja Valley (Arica-Chile) tolerates salinity stress when high levels of boron are available. Plant and Soil **267**, 73-84.

Beteta, E., Oreja, L., Prieto, A. & Rozas, M. (2012). Proyecto LIFE+: Estuarios del País Vasco: control y eliminación de *Baccharis halimifolia* en Urdaibai. In NEOBIOTA 2012-7th European Conference on Biological Invasions, ed. GEIB Grupo Especialista en Invasiones Biológicas. pp. 240-241, Pontevedra, Spain.

Campos, J. A. (2010). Flora alóctona del País Vasco y su influencia en la vegetación. Tesis Doctoral, Universidad del País Vasco, Bilbao.

Caño, L., Tens, M., Fuertes-Mendizabal, T., González-Moro, M. B. & Herrera, M. (2011). The role of plasticity, genetic variation and maternal effects in the tolerance to salinity in the invasive plant *Baccharis halimifolia*. 96th ESA Annual Meeting. Austin, Texas. ESA Austin, Texas.

Caño, L., Campos, J. A., García-Magro, D. & Herrera, M. (2013a). Replacement of estuarine communities by an exotic shrub: distribution and invasion history of *Baccharis halimifolia* in Europe. Biological Invasions 15, 1183-1188.

Caño, L., García-Magro, D. & Herrera, M. (2013b) Phenology of the dioecious shrub *Baccharis* along a salinity gradient: consequences for the invasion of Atlantic subhalophilous communities. *Plant Biosystems* 147, 1128-1138.

Caño, L., Campos, J.A, García-Magro, D., & Herrera, M. (2014). Invasiveness and impact of the non-native shrub *Baccharis halimifolia* in sea rush marshes: fine-scale stress heterogeneity matters. *Biological Invasions*. doi:10.1007/s10530-014-0648-7

GEIB (2006). TOP 20: Las 20 especies exóticas invasoras más dañinas presentes en España. GEIB, Serie Técnica N.2. León. 116 pp.

González-Moro, M. B., Lacuesta, M., Royuela, R., Muñoz-Rueda, A., & González-Murua, C. (1993). Comparative study of the inhibition of photosynthesis caused by aminooxyacetic acid and phosphinothricin in Zea mays. *Journal of Plant Physiology* **142**:161–166

Herrera, M. (1995). Estudio de la vegetación y flora vascular de la cuenca del río Asón (Cantabria).

IBM Corp. (2011). IBM SPSS Statistics for Windows, Version 20.0. Armonk, NY: IBM Corp

Krischik, V.A, Denno, R.F. (1990). Patterns of growth, reproduction, defense, and herbivory in the dioecious shrub *Baccharis halimifolia* (Compositae). *Oecologia* **83(2)**: 182-190.

Mack, R.N., Simberloff, D., Lonsdale, W.M., Evans, H., Clout, M., Bazzaz, F.A., (2000). Biotic invasions: Causes, epidemiology, global consequences, and control. *Ecological Applications* **10**, 689-710..

Panetta, F. D. (1979). Germination and seed survival in the woody weed, grounself bush (*Baccharis halimifolia*). *Australian Journal of Agricultural Research*, **30**, 1067-1077.

Prieto, A. (2006). Seguimiento de hábitat singulares y de flora alóctona en la reserva de la biosfera de Urdaibai: la planta invasora *Baccharis halimifolia*. Departamento de Medio Ambiente y Ordenación del Territorio, Gobierno Vasco, Vitoria-Gasteiz.

Richardson, D. M., Pysek, P., Rejmanek, M., Barbour, M. G., Panetta, F. D. & West, C. J. (2000). Naturalization and invasion of alien plants: Concepts and definitions. *Diversity and Distributions*, **6**, 93-107.

Tens, M. (2010). Efecto de la salinidad sobre la supervivencia y el crecimiento de la planta exótica invasora *Baccharis halimifolia*. Tesis de master. Universidad del País Vasco, Bilbao.

Tolliver, K. S., Martin, D. W. & Young, D. R. (1997). Freshwater and saltwater flooding response for woody species common to barrier island swales. *Wetlands*, **17**, 10-18.

Vilà, M., Castro, P., García-Berthou, E., (2008). Invasiones biológicas. CSIC. pp. 21-28. Madrid.

Westman, W. E., Panetta, F. D. & Stanley, T. D. (1975). Ecological studies on reproduction and establishment of woody weed, groundsel bush (*Baccharis halimifolia* L. - Asteraceae). *Australian Journal of Agricultural Research*, **26**, 855-870.

Williamson, M. & Fitter, A. (1996). The varying success of invaders. *Ecology*, **77**, 1661-1665.

Wilson, JB, King, W McG, Sykes, MT and Partridge, TR (1996). Vegetation zonation as related to the salt tolerance of species of brackish riverbanks. *Canadian Journal of Botany* **74**: 1079–1085.

Young, D. R., Erickson, D. L. & Semones, S. W. (1994). Salinity and the small-scale distribution for 3 barrier-island shrubs. *Canadian Journal of Botany- Revue Canadienne de Botanique* **72**, 1365-1372.