

Bioensayo de germinación con semillas de *Eruca sativa* Mill. Para la detección de salinidad y presencia de herbicida en agua

Foti, Ma.N.¹; Lallana, V. H.²

1- Becaria de Iniciación en la Investigación

2- Director PID-UNER 2076. Cátedra de Fisiología Vegetal. Facultad de Ciencias Agropecuarias. Universidad Nacional de Entre Ríos. Oro Verde. Entre Ríos. Argentina. Ruta Provincial 11; km 10,5. C C N° 24 (E3100WAA). Teléfono: 0343-4975075. Fax: 0343-4975096.

RESUMEN: Se analizó la incidencia de soluciones salinas y de herbicida sobre la germinación de semillas de *Eruca sativa* Mill., con el objetivo de poner a punto el ensayo y verificar la sensibilidad para determinar toxicidad. Para los tratamientos de salinidad se utilizaron soluciones de Cl K y Cl Na de 6,67; 4,50; 2,50 y 1,00 dS/m. Para los tratamientos con herbicida se emplearon 10 dosis de Tordon D30 (Picloram + 2,4 D) desde 15,2 a 0,003 g i.a. Ambos ensayos tuvieron un tratamiento Testigo con agua destilada. A las 48 horas se registró el número de semillas germinadas y la longitud radical. Se calculó un índice de germinación, y se lo expresó como porcentaje respecto al Testigo (100%). Tanto la salinidad como las soluciones de herbicidas no afectaron la germinación, pero sí el crecimiento radical; lo que permitió detectar diferencias entre tratamientos. La concentración efectiva media (CE 50) para el ensayo con herbicida fue de 2,33 g i.a.

Palabras clave: Bioensayo de germinación – Toxicidad – Rúcula.

SUMMARY: Bioassay of germination with *Eruca sativa* Mill. seeds for detection of salinity and herbicide in water. Foti, Ma.N.¹; Lallana, V. H.². The incidence of saline solutions and herbicide on *Eruca sativa* Mill. seed germination was analysed to adjust the assay and verify its sensitivity to determine toxicity. Solutions of Cl K and Cl Na 6.67; 4.50; 2.50 and 1.00 dS/m were used for salinity treatments while 10 doses of Tordon D30 (Picloram + 2,4 D) from 15.2 to 0.003 g i.a. were used for herbicide treatments. Both assays had a control treatment with distilled water. The number of germinated seeds and their roval length was recorded at 48 h. Germination rate was calculated and expressed as percentage of control treatment (100%). Though germination was not affected by salinity or herbicides, the radicular growth was affected and such event allowed detecting differences between treatments. The mean effective concentration (EC 50) for the herbicide assay was 2.33 g i.a.

Key words: Bioassay of germination – Toxicity - Rocket salad.

Correspondencia:

nfoti@fca.uner.edu.ar. Tel: 0343-4313134
Enrique Carbó 49 - (3100) Paraná. Entre Ríos.
vlallana@ceride.gov.ar. 0343-4270653
Los Aromos 871. (3100) Paraná. Entre Ríos.

Recibido: 10-12-04

Aceptado: 22-06-05

Introducción

Los bioensayos o pruebas biológicas son herramientas útiles para detectar la toxicidad de diversos compuestos (1). Consisten en métodos rápidos, de escasos requerimientos instrumentales que cuantifican respuestas biológicas en las etapas iniciales del desarrollo vegetal (2). Las pruebas de ecotoxicidad utilizan organismos vivos y procesos biológicos con el objeto de mensurar los efectos a corto y largo plazo de la exposición a sustancias químicas (3).

La reducción del porcentaje de germinación y/o inhibición del desarrollo radical de semillas recién germinadas, son las respuestas biológicas consideradas en bioensayos de germinación (2, 4). En las pruebas de fitotoxicidad se cuantifica la variación en presencia de distintas concentraciones del contaminante de algún objetivo de valoración previamente determinado en una especie vegetal. Sin embargo la incidencia de los efectos tóxicos sobre la etapa de germinación no ha sido tan estudiada. Las pruebas

de fitotoxicidad en la etapa de germinación tienen ventajas respecto a otros métodos ya que resultan mas rápidos y económicos (5).

La justificación para realizar este bioensayo radica en la importancia de eventos de desarrollo temprano basados en la velocidad de germinación que presenta la rúcula (4), si bien pueden utilizarse otras especies en diversos test biológicos como lechuga (6, 7, 8), rabanito (9) y berro (10), entre otras.

El objetivo es evaluar el comportamiento de las semillas de rúcula para detectar salinidad y presencia de herbicida en agua.

Materiales y Métodos

Se utilizó semilla de *Eruca sativa* Mill (rúcula) con un poder germinativo del 95 %. Se realizaron tres ensayos, uno con 4 concentraciones salinas de Cl K y un testigo (agua destilada), otro con 4 concentraciones salinas de Cl Na y un testigo (agua destilada), y otro con 10 soluciones de herbicida Tordon D30 (Picloram 6,41 g/100 cm³ + 2,4 D 24 g/100 cm³) y un testigo (agua destilada) según se indica en la Tabla 1.

Tabla 1: Tratamientos con sus valores de conductividad eléctrica (CE) y Molaridad de su concentración y dosis de herbicida ensayados en l.ha⁻¹ y gramos de ingrediente activo (g i.a.)

Tratamientos	Ensayo 1		Ensayo 2		Ensayo 3	
	Salinidad	Cl K	Salinidad	Cl Na	Dosis herbicida	
	CE (dS/m)	Molaridad	CE (dS/m)	Molaridad	l.ha ⁻¹	g i.a.
1	Testigo	0	Testigo	0	Testigo	0
2	6,67	0,050	6,67	0,066	0,05	15,205
3	4,50	0,034	4,50	0,045	0,005	1,521
4	2,50	0,019	2,50	0,025	0,0025	0,760
5	1,00	0,007	1,00	0,01	0,001	0,304
6					0,0005	0,152
7					0,00025	0,076
8					0,0001	0,03
9					0,00005	0,0152
10					0,000025	0,0076
11					0,00001	0,003

Para los ensayos de germinación se utilizaron cajas plásticas transparentes con tapa de 8 cm de diámetro y 3 cm de altura. En el fondo de cada recipiente se colocó papel absorbente embebido con 2 ml de la solución correspondiente a cada tratamiento donde se colocaron 10 semillas de rúcula, luego se tapó y se llevó a cámara de crecimiento a $25 \pm 1^\circ\text{C}$. Para cada tratamiento se realizaron 4 repeticiones de 10 semillas cada una.

A las 48 h se evaluó el número de semillas germinadas y la longitud de la raíz utilizando un calibre digital bajo lupa de mesa. Se calculó el promedio de la longitud radical y el porcentaje de germinación de cada repetición. Estos valores se utilizaron para obtener un índice de germinación (IG) multiplicando el número de semillas germinadas por la longitud media de la raíz, expresando ambos parámetros como porcentaje respecto al Testigo (9, 10, 11).

Los datos de longitud radical e IG se analizaron estadísticamente empleando la prueba de Dunnett (12), con un nivel de confianza del 95 %, comparando cada uno de los tratamientos con el Testigo. También se utilizó la prueba "t" para muestras apareadas con la que se comparó la longitud radical entre los ensayos de salinidad.

Resultados y Discusión

Ensayo 1: Salinidad Cl K

El porcentaje de germinación promedio en el ensayo de salinidad con Cl K fue del 95 %, idéntico al poder germinativo inicial de las semillas, lo cual indica que la germinación no se vio afectada por las concentraciones salinas ensayadas. Las diferencias se observaron en la longitud radical lo cual influyó directamente sobre los resultados del índice de germinación.

El IG de todos los tratamientos superó al del testigo (Fig.1), lo cual indicaría un efecto estimulante del crecimiento radical ante la presencia de Cl K.

Los niveles de salinidad considerados apropiados para la germinación de semillas y crecimiento de plántulas se encuentran entre 0,75 y 1,99 dS/m (13), con lo que se puede afirmar que la rúcula es una especie tolerante a la salinidad.

No se observaron diferencias significativas al comparar la longitud radical (mm) e IG de cada uno de los tratamientos con el testigo (Tabla 2).

Todos los tratamientos con Cl K presentaron una longitud radical mayor que el testigo y la mayor variabilidad se observó en el tratamiento 3 y en el Testigo, la menor en los tratamientos 4 y 5 (Fig. 3).

Figura 1: Índice de germinación (IG) en rúcula para los tratamientos de salinidad con Cl K expresados en valores de conductividad eléctrica (CE) comparados con el Testigo (100%, línea de puntos).

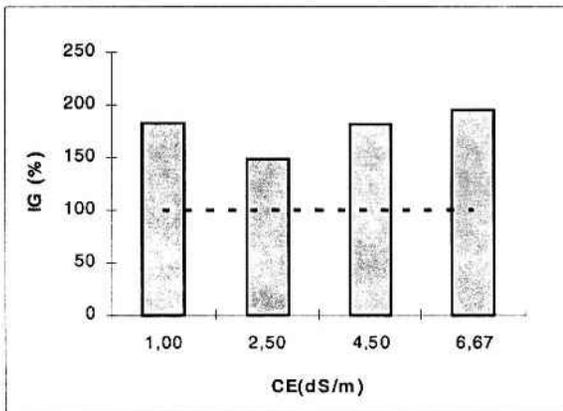


Tabla 2: Análisis de los datos de la longitud radical (mm) e IG de rúcula mediante la prueba de Dunnet, para el ensayo de salinidad con Cl K.

Comparación Tratamiento-Testigo	Diferencia entre medias long. rad.		Diferencia entre medias IG	
2 - 1	1,8300	ns	25,50	ns
3 - 1	1,6175	ns	23,00	ns
4 - 1	0,4250	ns	0,50	ns
5 - 1	1,7575	ns	24,50	ns

Mínima diferencia significativa long. rad. = 2,1971 Alta = 0.05

Mínima diferencia significativa IG = 38,141 Alta = 0.05

ns diferencia no significativa

Ensayo 2: Salinidad Cl Na

El porcentaje de germinación promedio en el ensayo de salinidad con Cl Na fue del 90 %.

Los resultados indicarían que la rúcula es una especie tolerante a la salinidad por Cl Na, ya que el IG fue mayor en todos los tratamientos con respecto al testigo (Fig.2).

Todos los tratamientos presentaron diferencias altamente significativas, en cuanto a longitud radicular, al compararlos con el testigo (Tabla 3). En cuanto al IG, todos los tratamientos excepto el 5 presentaron diferencias significativas al compararlos con el testigo (Tabla 3).

Todos los tratamientos con Cl Na presentaron una longitud radicular menor que el testigo, la cual disminuyó a medida que aumentó la concentración salina, no obstante las diferencias entre tratamientos - excluido el testigo - no fueron significativas, existiendo mayor variabilidad en el tratamiento 2 (Fig. 3).

El sodio (Na), para la mayoría de los vegetales tiene un efecto tóxico sobre el crecimiento vegetal y se absorbe selectivamente en menor cantidad que el K (14), lo cual explicaría la menor longitud radical registrada en el ensayo con dicho ión. El potasio, en cambio, es un elemento esencial para los vegetales y normalmente tiende a acumularse en tejidos en mayores concentraciones que las del medio de donde se nutre. Se ha descrito para el K una razón de

acumulación aproximada de 250 a 1 para las plantas en general (14).

Ensayo 3: Herbicida

El porcentaje de germinación promedio en el ensayo con herbicida fue del 89 % y teniendo en cuenta que el poder germinativo inicial de las semillas fue del 95 %, se observó que no hubo una marcada incidencia negativa en los porcentajes de germinación con las dosis ensayadas. Al igual que en los ensayos anteriores de salinidad las diferencias entre los tratamientos se detectaron en el crecimiento de la raíz.

La mayoría de los tratamientos con herbicida manifestaron una disminución mayor al 50% del IG respecto al testigo (Fig.4).

Con las soluciones de herbicida de mayor concentración se observaron coloraciones anormales (blanquecinas y violáceas) en los cotiledones y en raíz.

Los tratamientos presentaron diferencias altamente significativas con respecto a longitud radical e IG, al compararlos con el testigo (Tabla 4). Se calculó la concentración efectiva media (CE 50) definida como la concentración que reduce la longitud radical en un 50 % en relación con el testigo (15). Se halló la línea de tendencia que mejor ajustó a los datos, a partir de la cual se pudo establecer el valor de 2,33 g i.a. del herbicida Tordon D30 para la CE 50 (Fig.5).

Figura 2: Índice de germinación (IG) en rúcula para los tratamientos de salinidad con Cl Na expresados en valores de conductividad eléctrica (CE) comparados con el Testigo (100%, línea de puntos).

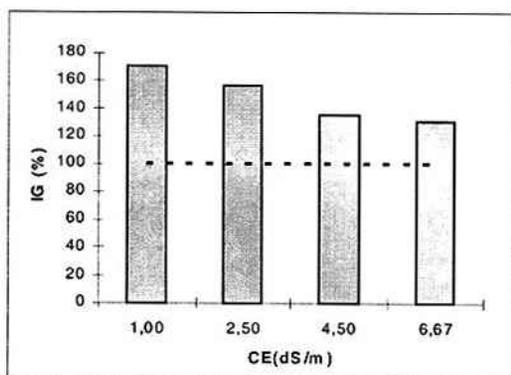


Tabla 3: Análisis de los datos de la longitud radical (mm) e IG de rúcula mediante la prueba de Dunnet, para el ensayo de salinidad con Cl Na.

Comparación Tratamiento – Testigo	Diferencia entre medias long. rad.		Diferencia entre medias IG	
2 – 1	1,550	***	44,13	***
3 – 1	1,377	***	44,97	***
4 – 1	1,300	***	36,32	***
5 – 1	1,280	***	30,09	ns

Mínima diferencia significativa long. rad. = 1,0477 Alfa = 0.05

Mínima diferencia significativa IG = 35,594 Alfa = 0.05

ns diferencia no significativa ***diferencia altamente significativa

Figura 3: Longitud radical (mm) en rúcula comparando los tratamientos de salinidad mediante Prueba "t" para muestras apareadas.

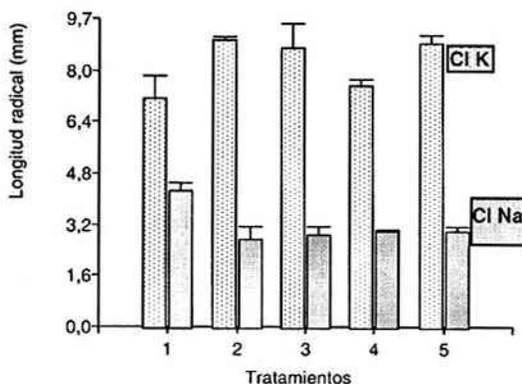


Figura 4: Índice de germinación (IG) en rúcula en los tratamientos (2 a 11, Tabla 1) con herbicida expresados en gramos de ingrediente activo (g i.a.) comparados con el Testigo (100%, línea de puntos).

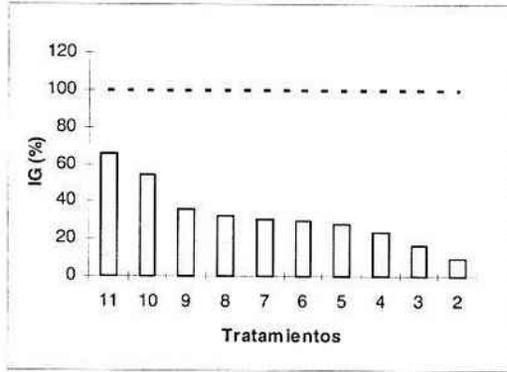


Tabla 4: Análisis de los datos de la longitud radical (mm) e IG de rúcula mediante la prueba de Dunnet, para el ensayo de herbicida.

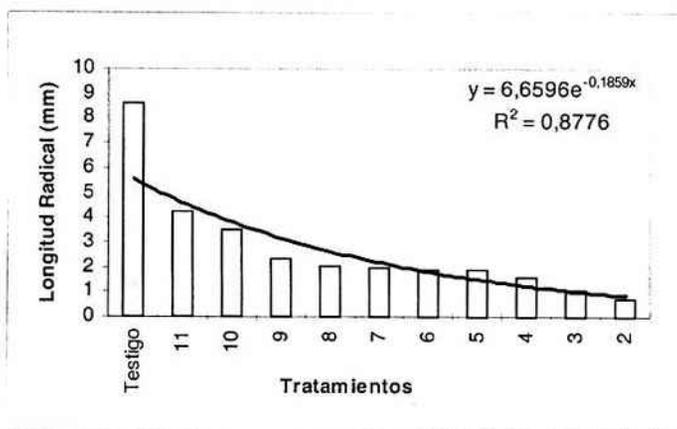
Comparación Tratamiento - Testigo	Diferencia entre medias long. rad.		Diferencia entre medias IG	
2 - 1	7,8900	***	92,468	***
3 - 1	7,5225	***	87,330	***
4 - 1	7,0525	***	82,008	***
5 - 1	6,7450	***	79,145	***
6 - 1	6,7375	***	77,158	***
7 - 1	6,6850	***	76,470	***
8 - 1	6,6250	***	75,795	***
9 - 1	6,3100	***	72,628	***
10 - 1	5,1525	***	59,220	***
11 - 1	4,4100	***	50,098	***

Mínima diferencia significativa long. rad. = 1,8725 Alfa = 0.05

Mínima diferencia significativa IG = 25,734 Alfa = 0.05

*** diferencia altamente significativa.

Figura 5: Línea de tendencia obtenida relacionando longitud radical de las semillas de rúcula (mm) para los tratamientos (2 a 11, tabla 1) de herbicida y el testigo.



Conclusiones

– Tanto la salinidad como las soluciones de herbicidas no afectaron la germinación pero si el crecimiento radical, lo que permitió detectar diferencias entre tratamientos.

– Todas las concentraciones salinas de Cl K y de Cl Na favorecieron el crecimiento radical, lo cual indicaría que la rúcula es tolerante a condiciones de alta salinidad en las primeras etapas de vida.

– La concentración efectiva media (CE 50) para el ensayo con herbicida fue de 2,33 gramos de ingrediente activo.

Bibliografía

- González, A. M.; Presa, M.F.; Lurá, M.C. 2003. Ensayo de Toxicidad a *Artemia salina*: puesta a punto y aplicación a micotoxinas. Revista FABICIB. Volumen 7: 117-122.
- Ortega, M. C.; Aguado, M. T.; Ordovás, J.; Moreno, M.T.; Carmona, E. 2000. Propuesta de Bioensayos para detectar factores fitotóxicos en sustratos y enmiendas. Actas de Horticultura, **32**: 363-376.
- Ríos, S.M.; Nudelman, N. 2000. Contaminación de suelos por la explotación petrolera. Fitotoxicidad en la etapa de germinación. Ingeniería Sanitaria y Ambiental, **49**: 53-58.
- Torres Rodríguez, M.T. Empleo de los ensayos con plantas en el control de contaminantes tóxicos ambientales. http://bvs.sld.cu/revistas/hie/vol41_2-3_03/hie092-3203.htm [consulta 08/06/04]
- Lewis, M. 1995. Use of Freshwater Plants for Phytotoxicity Testing: A Review. Environmental Pollution, **87**: 319-336.
- Souto, X.C.; González, L.; Reigosa, M. J. 1993. Estudio de los efectos alelopáticos producidos por partes aéreas de distintas especies arbóreas (*Eucalyptus globulus*, *Acacia melanoxylon*, *Quercus robur*, *Pinus radiata*) en descomposición en el suelo. Actas del I Congreso Forestal Español. Volumen I: 189-193.
- Waligora, D. 2003. Rape glucosilones and alfalfa saponins as allelopathic factors for lettuce seed's germination. Journal of Plant Protection Research, **37**: 109-112.
- Chou, Ch. 1999. "Methodologies for allelopathic research: from fields to laboratory. Recent Advances in Allelopathy" (Universidad Cádiz). Eds. Macías, Galindo, Molinillo y Cutler. Vol I: 3-24.
- Lallana, V. H.; Cardona, O.; Valenzuela O.R. 2000. Bioensayo de germinación como test rápido para la valoración de lombricompostos. II Encontro Nacional de Sustratos para Plantas (II ENSUB). Florianópolis, SC-Brasil, Resumos pag. 74-76.
- Abad, M.; Martínez, M.D.; Martínez, P.F. y Martínez, J., 1993. Evaluación agronómica de los sustratos de cultivo. Actas de Horticultura, **11**: 141-154.
- Lallana, V. H.; Valenzuela, O. R.; Lallana, M.C.; Tonelli, B.

- B.; Rothman, S. M. 2000. Valoración física, química y biológica de lombricompuestos de residuos de conejeras. I Encontro Nacional sobre substrato para plantas. Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil. Substrato para plantas: a base da produção vegetal em recipientes: 217-223.
12. Montgomery, D.C. 1999. "Diseño y Análisis de Experimentos" Grupo Editorial Iberoamericana (Col. Cuajimalpa, Méjico).Capítulo III: 45-84.
13. Abad, M.; Noguera Murria, P. 1997. Los sustratos en los cultivos sin suelo. "Manual de cultivo sin suelo". Coord. M. Urrestarazu Gavilán. Manuales Univ. Almería. Capítulo III: 101-116.
14. Salisbury, F.B.; Ross, C.W. 1994. "Fisiología Vegetal". Grupo Editorial Iberoamericana, (Col. San Rafael, Méjico). Capítulo 7:149-175.
15. Dutka, B. J. 1989. «Methods of microbiological and toxicological analysis of waters, wastewaters and sediments». National Water Research Institute (NWRI). Canadá, Burlington.