



PALABRAS CLAVE: Herbicidas. Toxicidad. *Eruca sativa* y *Lactuca sativa*.

KEY WORDS: Herbicides, toxicity, *Eruca sativa* and *Lactuca sativa*

# Bioensayos de germinación para detectar un herbicida hormonal en muestras de agua, vegetales y de suelo

María Natalia Foti y Víctor Hugo Lallana

Facultad de Ciencias Agropecuarias UNER.  
Ruta Provincial 11 km 10,5. Te.: 0343-4975075  
Int. 122. C.C. 24, E3100WAA Paraná.

E-mail: [mfoti@fca.uner.edu.ar](mailto:mfoti@fca.uner.edu.ar),  
[victorl@fca.uner.edu.ar](mailto:victorl@fca.uner.edu.ar)

## RESUMEN

Se analizó la incidencia de distintas dosis del herbicida Tordon D30® sobre la germinación de semillas de rúcula (*Eruca sativa* Mill) y lechuga (*Lactuca sativa* L.) con el objetivo de determinar la sensibilidad de los bioensayos de germinación para detectar toxicidad en muestras de agua, vegetales y suelo. Se realizó un bioensayo con rúcula y dosis de herbicida desde 0,003 a 15,2 gramos de ingrediente activo (g i.a.), y otro con lechuga y dosis de 0,003 y 0,0076 g i.a.. A las 48 hs en rúcula y 72 hs en lechuga, se evaluó número de semillas germinadas, longitud radical y se calculó un índice de germinación (IG). Todos los tratamientos presentaron diferencias significativas con respecto a longitud radical e IG, al compararlos con el testigo (agua destilada). Ambas especies resultaron sensibles para detectar herbicida en agua. La concentración efectiva media ( $CE_{50}$ ) para rúcula fue de 2,33 g i.a.. Con muestras de suelo y plantas de Caraguatá (*Eryngium horridum* Malme), tratadas (dosis 912,3 g i.a.) y sus testigos, se efectuó otro bioensayo con rúcula. El extracto acuoso de hojas molidas no tuvo ningún efecto sobre el IG. Todos los tratamientos con herbicida presentaron diferencias significativas en cuanto a longitud radical con respecto al testigo. Para cada tratamiento se calculó la concentración de herbicida (g i.a.) a partir de una ecuación de ajuste.

## ABSTRACT

### *Germination bioassay to detect herbicides in water, plant and soil samples*

*The incidence of different doses of Tordon D 30® was analyzed on germination of rocket salad (Eruca sativa Mill) and lettuce (Lactuca sativa L.) seeds with the aim of determine the germination bioassay sensitiveness to detect toxicity in water, plant and soil samples. A bioassay was carried out with rocket salad and herbicide doses from 0.003 to 15.2 g of active ingredient (g a.i.) and another with lettuce and herbicide doses at 0.003 and 0.0076 g a.i. After 48 hours of rocket salad and 72 hours in lettuce, the number of germinated seeds and radical length were*



evaluated and a germination index (GI) was calculated. All treatments presented significant differences as regards radical length and GI when compared with control assay (distilled water). Both species showed to be sensitive to detect herbicide in water. Median effective concentration ( $EC_{50}$ ) for rocket salad was 2.33 g a.i. With treated soil and plant samples of Caraguata (*Eryngium horridum* Malme), (doses of 912.3 g a.i.) and the corresponding control assays, another bioassay with rocket salad was carried out. All herbicide treatments presented significant differences as regards radical length when compared with control assay. In every treatment, the herbicide concentration (g a.i.) was calculated using an adjustment equation.

## INTRODUCCION

Los bioensayos o pruebas biológicas son herramientas útiles para detectar la toxicidad de diversos compuestos (González *et al.*, 2003). Consisten en métodos rápidos, de escasos requerimientos instrumentales que cuantifican respuestas biológicas en las etapas iniciales del desarrollo vegetal (Ortega *et al.*, 2000). 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 (Ríos y Nudelman, 2000). Además, permiten calcular la  $CE_{50}$  definida como la concentración efectiva media que reduce o inhibe la longitud radical en un 50 % en relación con el testigo (Torres Rodríguez, *et al.*, 2006).

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 (Ortega *et al.*, 2000; Torres Rodríguez, 2003). En las pruebas de fitotoxicidad se emplean distintas concentraciones del contaminante con algún objetivo de valoración previamente determinado. Sin embargo, la incidencia de los efectos tóxicos sobre la etapa de germinación, no ha sido tan estudiada. Aunque tienen ventajas respecto a otros métodos ya que resultan más rápidas y económicas (Lewis, 1995).

La elección del material biológico adecuado para los bioensayos de germinación radica en la importancia del desarrollo temprano basado en la velocidad de germinación de la rúcula y la lechuga.

El objetivo fue determinar la sensibilidad de estos bioensayos para detectar presencia de un herbicida hormonal en muestras de agua, vegetales y suelo, para evaluar la toxicidad.

## MATERIAL Y METODOS

Se realizaron ensayos de germinación con rúcula

(*Eruca sativa* Mill) y con lechuga (*Lactuca sativa* L). Para ambas especies se procedió de la misma manera con excepción del tiempo de incubación en cámara de crecimiento que fue de 48 hs para rúcula (Foti y Lallana, 2005) y 72 hs para lechuga (Aquatox 2000, Foti *et al.*, 2005).

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 y el testigo con agua destilada, donde se colocaron 10 semillas, luego se taparon y se llevaron a cámaras de crecimiento a  $25 \pm 1^\circ\text{C}$ . Para cada tratamiento se realizaron 4 repeticiones de 10 semillas cada una.

A las 48 y 72 hs según la especie, se evaluó el número de semillas germinadas y la longitud de la raíz primaria, 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 primaria, expresando ambos parámetros como porcentaje respecto al testigo (Ortega *et al.*, 2000). Los datos de longitud radical e IG se analizaron estadísticamente empleando la prueba de Dunnett (Montgomery, 1999), con un nivel de confianza del 95 %, comparando cada uno de los tratamientos con el testigo.

Se efectuaron 2 ensayos: Ensayo 1 para evaluar la sensibilidad de los materiales biológicos a distintas dosis de solución herbicida y el Ensayo 2 para detectar la presencia de herbicidas en muestras vegetales y de suelo.

### Ensayo 1:

Se emplearon semillas de rúcula y lechuga con un poder germinativo del 95 y 93 % respectivamente. Se utilizaron soluciones del herbicida hormonal Tordon D30® (Dow Agroscience) compuesto de 21 % de Picloram (6.41 g / 100 cm<sup>3</sup>) + 79 % de 2,4 D (24 g / 100 cm<sup>3</sup>) empleando las dosis referidas en el Cuadro 1 para los 11 tratamientos de rúcula y 3 de lechuga.

### Ensayo 2:

Para la detección del herbicida hormonal en muestras



vegetales, se utilizó *Eryngium horridum* Malmé ("caraguatá") especie común en los pastizales naturales de la Provincia de Entre Ríos. La biología y aspectos reproductivos de esta especie han sido ampliamente estudiadas (Lallana, 2005 b) con fines a lograr un control integrado. Asimismo los estudios vinculados a la penetración y traslados de herbicidas en la planta son recientes y escasamente estudiados (Billard *et al.*, 2005; Lallana *et al.*, 2006)

Se eligieron 8 plantas de aproximadamente 50 cm de diámetro medio. Cuatro se utilizaron como testigo y en las restantes se realizó una aplicación de solución de herbicida Tordon D30® (3 l/ha) con un

pulverizador manual a presión en 4 macetas que sólo contenían suelo del lugar (Molisol).

**Testigo agua destilada:** Se utilizaron 4 cajas plásticas con tapa. En el fondo de cada una se colocó papel absorbente embebido con agua destilada donde se colocaron 10 semillas de rúcula.

**Plantas testigo:** A las 48 horas se cortaron las hojas y se lavaron haciendo correr 500 ml de agua destilada para eliminar impurezas y materiales adheridos a la superficie foliar. Luego, se despinaron y se secaron con papel absorbente. Se les cortaron las puntas y la pequeña parte oxidada de la base, se cortaron en trozos y se colocó una alícuota de 20 g en el vaso de

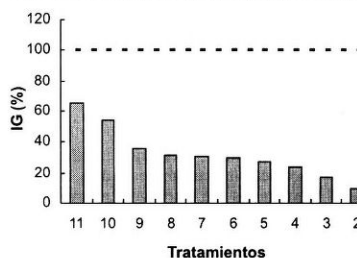


Figura 1

Índice de germinación (IG) en rúcula para los tratamientos con herbicida (2 a 11, ver Cuadro 1) comparados con el Testigo (100%, línea de puntos)

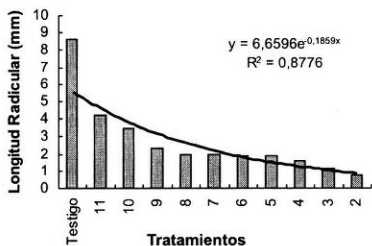


Figura 2

Línea de tendencia obtenida relacionando longitud radical de las semillas de rúcula (mm) para los tratamientos (2 a 11) de herbicida y el testigo

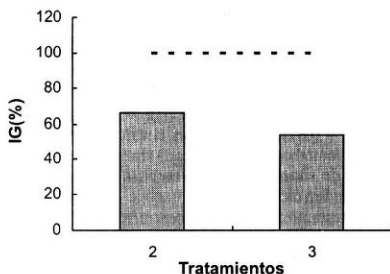


Figura 3

Índice de germinación (IG) en lechuga para los tratamientos con herbicida (2 y 3, Cuadro 1) comparados con el Testigo (100%, línea de puntos)

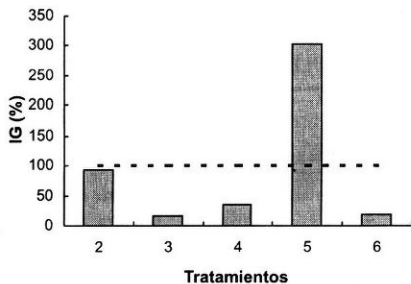


Figura 4

Índice de germinación (IG) en rúcula en los tratamientos (2 a 6 del ensayo 2) comparados con el Testigo (100%, línea de puntos)



una licuadora con 40 ml de agua destilada. Se licuaron durante 5 minutos y el líquido se filtró utilizando bomba de vacío. El extracto acuoso resultante se utilizó para los ensayos de germinación.

**Plantas tratadas con herbicida:** Se procedió igual que con la planta testigo, utilizando 40 g de hojas cortadas con 80 ml de agua para el proceso de licuado, filtrado y extracción. El extracto acuoso se dividió en 2 partes, extracto puro y diluido a la mitad con agua destilada. Se montaron dos bioensayos uno con cada extracto.

**Suelo testigo y tratado con herbicida:** Se extrajo suelo de la capa superficial de las macetas tratadas. Utilizando un mortero se molió para homogeneizar el tamaño de las partículas y se colocaron 30 g en las cajas plásticas y se humedecieron con 15 ml de agua destilada. Se colocaron 10 semillas de rúcula por caja (4 repeticiones de testigo y 4 repeticiones de suelo tratado), y se llevó a cámara de crecimiento.

La identificación final de los tratamientos del Ensayo 2 fue:

- T 1 Testigo agua destilada
- T 2 Plantas testigo (extracto acuoso de hojas)
- T 3 Plantas tratadas con herbicida (extracto acuoso de hojas puro)
- T 4 Plantas tratadas con herbicida (extracto acuoso de hojas diluido al 50 %)
- T 5 Suelo testigo
- T 6 Suelo tratado con herbicida

## RESULTADOS Y DISCUSION

### Ensayo 1

El porcentaje de germinación promedio en rúcula 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 la germinación con las dosis ensayadas, sino que las diferencias entre los tratamientos se detectaron en el crecimiento de la raíz primaria. La mayoría de los tratamientos con herbicida manifestaron una disminución mayor al 50% del IG respecto al testigo (Fig. 1).

Todos presentaron diferencias altamente significativas con respecto a longitud radical e IG, al

compararlos con el testigo (Cuadro 2).

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 (Torres Rodríguez *et al.*, 2006). Se halló la línea de tendencia que mejor se 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. 2).

En esta primera instancia se pudo determinar que el bioensayo de germinación con semillas de rúcula es sensible para detectar diferentes dosis de herbicida en solución acuosa.

En cuanto a la experiencia con semillas de lechuga, si bien fueron pocas las diluciones probadas, se pudo observar que esta especie también es sensible para detectar herbicida ya que las dosis utilizadas tenían muy baja concentración de ingrediente activo. El IG se afectó en más del 40% respecto al testigo (Fig. 3) con las dosis ensayadas. Existieron diferencias significativas en cuanto IG y longitud radical al comparar el tratamiento 3 con el testigo; no siendo así para el tratamiento 2.

### Ensayo 2

Todos los tratamientos presentaron diferencias altamente significativas con respecto a la longitud radical al compararlos con el testigo. En cuanto a IG todos los tratamientos presentaron diferencias significativas al compararlos con el testigo, excepto el tratamiento 2 (Cuadro 3). Con esta última comprobación, se podría afirmar que el extracto acuoso de hojas de "caraguatá" no tiene ningún efecto sobre el IG, aunque sí afecta la longitud radical. El IG del tratamiento 2 fue similar al testigo. Los tratamientos 3, 4 y 6 estuvieron por debajo del 50 % respecto al testigo y el tratamiento 5 (suelo) mostró una diferencia positiva y significativa con el testigo (Fig. 4 y Cuadro 3).

Se halló la concentración de herbicida en gramos de ingrediente activo (g i.a.) para los tratamientos con herbicida. Dichos valores se obtuvieron a partir de la ecuación hallada en el Ensayo 1 (Fig. 2),  $Y = 6,6596 e^{0,1859 x}$  ( $R^2 = 0,8776$ ), donde Y es el valor de longitud radical promedio obtenida en cada tratamiento y x es el valor de concentración de herbicida (g i.a.) que corresponde a dicha longitud.

Para el tratamiento 3, la concentración hallada de herbicida fue de 11,47 g i.a.; para el tratamiento 4 fue de 0,12 g i.a.; y para el tratamiento 6 fue de 10,89 g i.a.

La solución siendo utilizada en planta y suelo de Tordon D30® (3 l/ha), correspondió a una concentración de 912,3 g i.a., detectada en el suelo y en la planta de magnitud varias veces inferior.

Si bien se señalan otras especies como berro



**Cuadro 1.**  
Dosis de herbicida utilizados en bioensayos con rúcula y lechuga

Tratamientos	RUCULA		LECHUGA	
	l.ha <sup>-1</sup>	g l.a.	l.ha <sup>-1</sup>	g l.a.
1	Testigo	0	Testigo	0
2	0,05	15,205	0,00001	0,003
3	0,005	1,521	0,000025	0,0076
4	0,0025	0,760		
5	0,001	0,304		
6	0,0005	0,152		
7	0,00025	0,076		
8	0,0001	0,030		
9	0,00005	0,0152		
10	0,000025	0,0076		
11	0,00001	0,003		

**Cuadro 2.**

Análisis de los datos de la longitud radical (mm) e IG de rúcula mediante la prueba de Dunnet para el ensayo 1. (Tratamientos ver Cuadro 1)

Mínima diferencia significativa long. rad. = 1,8725 Alfa = 0,05  
Mínima diferencia significativa IG = 25,734 Alfa = 0,05

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 ***

\*\*\* diferencia altamente significativa.

**Cuadro 3**

Análisis de los datos de la longitud radical (mm) e IG de rúcula mediante la prueba de Dunnet, para el ensayo 2 de herbicida en muestras vegetales y de suelo  
Mínima diferencia significativa long. rad. = 2,70 Alfa = 0,05  
Mínima diferencia significativa IG = 41,20 Alfa = 0,05

Comparación Tratamiento - Testigo	Diferencia entre medias long. rad.		Diferencia entre medias IG	
2 - 1	5,8178	***	41,15	ns
3 - 1	6,5550	***	90,26	***
4 - 1	5,9075	***	78,08	***
5 - 1	2,3022	***	83,51	***
6 - 1	6,4650	***	88,68	***

\*\*\* diferencia altamente significativa.

ns diferencia no significativa.

(*Nasturtium officinale* R. Br.), trigo (*Triticum aestivum* L.) y arroz (*Oriza sativa* L.) para bioensayos de toxicidad (Ortega *et al.*, 2000), la rúcula parece ser un material biológico muy sensible para la detección de sustancias tóxicas y en particular de herbicidas en agua (Foti y Lallana, 2005; Foti *et al.*, 2005). En este sentido Lallana (2005) también ha evaluado rúcula y rabanito.

Los distintos bioensayos realizados con rúcula para la detección de salinidad (Foti y Lallana, 2005) y contaminantes en agua han permitido poner a punto la técnica con dicha especie, lo cual servirá de base para la elaboración de un protocolo teniendo en cuenta normas internacionales

**CONCLUSION**

Los bioensayos de germinación con rúcula y lechuga permitieron detectar la presencia de un herbicida hormonal en muy bajas concentraciones en muestras de agua. También se verificó la sensibilidad de los bioensayos para detectar restos de herbicida en muestras de suelo y extractos acuosos de vegetales.

**AGRADECIMIENTOS**

Este trabajo fue financiado en el marco del PID-UNER 2076, siendo el primer autor Becario de

Iniciación en la Investigación de la Universidad Nacional de Entre Ríos.

**REFERENCIAS**

- AQUATOX 2000: Cuaderno de Actividades. <http://www.idrc.ca:8080/aquatox/sp/experiment/intro.html> [consulta 08/06/04].
- Billard, C.; M. del C. Lallana.; J. Elizalde.; N. Foti, 2005. Efecto de un herbicida hormonal en aplicaciones en el haz y el envés de hojas de *Eryngium horridum* Malme. *Rev. cient. agropecu.* 9(1): 13-17.
- Foti, M. N.; C. E. Billard.; V. H. Lallana, 2005. Bioensayos de germinación con semillas de rúcula y lechuga para monitoreo de calidad de agua. *Rev. cient. agropecu.* 9(1): 47 - 53
- Foti, M. N.; V. H. Lallana, 2005. Bioensayo de germinación con semillas de *Eruca sativa* Mill. para la detección de salinidad y presencia de herbicida en agua. *Revista FABICIB*, Vol. 9:9-16
- González, A. M.; M.F. Presa, ;M.C. Lurá, 2003. Ensayo de toxicidad a *Artemisa salina*: puesta a punto y aplicación a micotoxinas. *Revista FABICIB*, Vol. 7: 117 - 122.
- Lallana, V.H. 2005a. Bioensayos de germinación con rabanito y rúcula para la valoración de sustratos. IV Reunión de Comunicaciones



- Científicas y Técnicas y II de Extensión. FCA. Oro Verde, 3 de junio de 2005. Resumen p. 26.
- Lallana, V.H. 2005b. Reproducción sexual de *Erygium horridum* Malme en pastizales naturalizados de Entre Ríos, 219 p. Tesis de Doctorado. Universidad Nacional de Rosario.
- Lallana, M. del C.; Billard, C.; Elizalde, J.H.I.; Lallana, V.H. 2006. Breve revisión sobre las características de la cutícula vegetal y penetración de herbicidas. *Rev. Ciencia, Docencia y Tecnología*, 17(33):229-241.
- Lewis, M. 1995. Use of Freshwater Plants for Phytotoxicity Testing. *Environ. Pollut.* 87: 319-336.
- Montgomery, D.C. 1999. Diseño y Análisis de Experimentos. Col. Cuajimalpa, Méjico. Grupo Editorial Iberoamericana. 589 p.
- 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. *Ing. Sanitaria y Ambiental* 49: 53 - 58.
- Torres Rodríguez, M. T.; García Melián, M.; M.: Hernández Perera, N.M. Fernández Novo, M. 2006. Toxicidad agua de lixiviados acuosos mediante un ensayo con *Latuca sativa* L. *Higiene y sanidad Ambiental* 6: 170-172.

Recibido / Received /: 18 junio 2005.  
Aceptado / Accepted /: 1 diciembre 2008.