

Determinación de reducción del crecimiento radical (CE50) por una formulación de glifosato utilizando lechuga y trigo como especies bioindicadoras

Determination of root length reduction (EC50) by a glyphosate formulation using lettuce and wheat as biological indicator species

María del C. Lallana ¹

Víctor H. Lallana ^{1,2}

Cristina E. Billard ¹

María Natalia Foti ^{1,2}

José H. I. Elizalde ¹

Originales: Recepción: 30/10/2011 - Aceptación: 10/10/2012

RESUMEN

El objetivo fue determinar la concentración efectiva media de reducción del crecimiento radical (CE50), de una formulación del herbicida glifosato mediante bioensayos de germinación con semillas de lechuga y de trigo. Para lechuga se probaron 9 dosis/tratamientos decrecientes entre 1.215 y 0,01215 g i.a.ha⁻¹ (formulado: Sal amónica de la N-Fosfonometil glicina, 40,5 [g e.a. glifosato 36,9% p/v]) y para trigo 5 dosis decrecientes (entre 12,15 y 1,215 g i.a.ha⁻¹) y su respectivo control negativo (agua destilada). Se utilizaron cajas de Petri, con papel de filtro en la base humedecido con 3 ml de la solución correspondiente. Se sembraron 20 semillas por caja, distribuyéndose los tratamientos en bloques al azar con 4 repeticiones, en cámara de crecimiento a 20°C con alternancia de luz y oscuridad. Se midió la longitud radicular de todas las semillas de cada tratamiento con calibre digital. Se determinó el porcentaje de germinación y se calculó el índice de germinación. Las CE50, es decir, las dosis que redujeron en un 50% el crecimiento radical para lechuga y trigo, fueron 6,682 y 9,416 g i.a.ha⁻¹, respectivamente. Los materiales probados resultaron sensibles a distintas dosis de glifosato y por lo tanto pueden utilizarse como indicadores biológicos de toxicidad específica.

ABSTRACT

The objective of this work was to determine a glyphosate formulation effects on the root length reduction (average effective concentration: EC50) using germination bioassays with lettuce and wheat seeds. For lettuce nine decreasing doses/treatments between 1,215 and 0.01215 g a.i.ha⁻¹ (formulated as: N phosphonomethyl glycine ammonium salt 40.5 [g e.a. glyphosate 36.9% p/v]) and for wheat five decreasing doses (12.15 and 1.215 g a.i.ha⁻¹) and their respective negative controls (distilled water) were tested. Bioassays were carried out in Petri boxes with wet filter paper with 3 ml of corresponding solution. Twenty seeds were sowed per box, treatments being distributed in blocks at random with 4 repetitions in germination chamber under alternating light and dark condition at 20°C. All seed average root length and repetition were estimated with a digital caliper. The average germination percentage of treatments and the germination index was also determined. EC50 or doses reducing 50% their radical growth for lettuce and wheat were 6.682 and 9.416 g a.i.ha⁻¹. Plant materials tested resulted sensitive to the different glyphosate doses and they can be used as biological indicators of the specific toxicity.

1 Docentes investigadores, Cátedra de Fisiología Vegetal. Facultad de Ciencias Agropecuarias. Universidad Nacional de Entre Ríos (UNER). Ruta 11, km 10. (3101) Oro Verde, Paraná, Entre Ríos. maryl@fca.uner.edu.ar

2 Cátedra de Fisiología Vegetal. Facultad de Ciencia y Tecnología. Universidad Autónoma de Entre Ríos (UADER).

Palabras clave

germinación • toxicidad • pruebas biológicas • glifosato

Keywords

germination • toxicity • biological test
glyphosate

INTRODUCCIÓN

En la última década se han incrementado los estudios sobre los impactos adversos del uso de plaguicidas en los ecosistemas de la región pampeana, especialmente el uso del herbicida glifosato. Así se ha prestado especial atención a la contaminación de suelos y aguas por el uso de plaguicidas, especialmente en zonas de intensa actividad agrícola, como es el caso de los cultivos de soja o arroz en la provincia de Entre Ríos.

No obstante, el sistema productivo se desarrolló a una velocidad mucho mayor que la generación de la información científica sobre el comportamiento ambiental de los plaguicidas (11).

Existen métodos analíticos por cromatografía que permiten detectar residuos de glifosato y su principal metabolito, el ácido amino metil fosfónico (AMPA) en aguas, pero estas técnicas resultan costosas y complejas, por lo cual se hace necesario identificar y validar técnicas alternativas, más económicas y sencillas que resulten igualmente sensibles para la detección de residuos de glifosato en suelos y aguas (1). Los bioensayos con plantas indicadoras para la detección de residuos de herbicidas son una posibilidad (4).

Las pruebas de fitotoxicidad empleando plantas terrestres han comenzado a usarse más frecuentemente en ecotoxicología, ya que presentan ventajas sobre los ensayos tradicionales, al permitir trabajar con muestras de aguas turbias o coloreadas. Las pruebas de ecotoxicidad utilizan organismos vivos y procesos biológicos con el objeto de mensurar los efectos a corto y mediano plazo de la exposición a sustancias químicas (9).

Los bioensayos de germinación permiten trabajar con muestras de agua sin necesidad de filtrado, en ensayos estáticos, semiestáticos y de flujo continuo y con un mínimo costo (13). Constituyen un método rápido, económico y práctico para determinar la calidad de agua de diferentes orígenes, sedimentos y lodos. Se basan en la reducción del porcentaje de germinación y/o del crecimiento radical que experimentan las plántulas de varias especies sensibles al ser sometidas a diferentes sustancias. Además, permiten calcular la concentración de la sustancia que provoca una reducción del 50% (CE50) en la elongación de la raíz con respecto al testigo (8, 12).

Iannacone *et al.* (5), en bioensayos de germinación para determinar ecotoxicidad de clorpirifós y lindano, trabajaron con semillas de lechuga y tomate. En tomate encontraron que la respuesta subletal media del clorpirifós fue 36 veces mayor que la del lindano.

Bioensayos de germinación con rúcula se utilizaron para detectar salinidad y presencia de herbicidas en agua (2). En otros ensayos trabajaron con semillas de rúcula y de lechuga y hallaron que en muestras de agua, el picloram + 2,4 D se pudo detectar en muy bajas concentraciones ($0,00001 \text{ L ha}^{-1}$); asimismo verificaron la sensibilidad de estos ensayos para detectar este herbicida en muestras de suelo y de extractos acuosos de vegetales (3).

Forero *et al.* (1) trabajaron con varias especies para detectar glifosato en aguas y suelos; sin embargo, la lechuga fue la que mostró la mejor respuesta siendo la mejor especie bioindicadora de residuos de glifosato entre las cinco evaluadas. Determinaron, además, que estos bioensayos permiten detectar presencia de herbicidas en agua, pero no sirven para detectar trazas. Mediante técnicas analíticas se puede detectar la cantidad total del herbicida en una muestra (fracción biodisponible y no disponible) y mediante los bioensayos se puede detectar la biodisponibilidad del compuesto que puede ser tomado por el organismo indicador (fracción disponible).

En los análisis para determinar calidad de agua es muy importante utilizar métodos aprobados y estandarizados, que se deben repetir periódicamente debido a la variabilidad natural de las poblaciones de análisis y las condiciones durante las determinaciones.

Objetivo

- Determinar la concentración efectiva media (CE50) de reducción del crecimiento radical por una formulación del herbicida glifosato mediante bioensayos de germinación con semillas de lechuga y de trigo.

MATERIALES Y MÉTODOS

El bioensayo de lechuga (*Lactuca sativa* L. var. mantecosa) se realizó utilizando cajas de Petri con papel de filtro en la base, humedecido con 3 ml de la solución herbicida correspondiente o agua destilada (control negativo).

Se rotularon las cajas y se sembraron 20 semillas de lechuga en cada una, se taparon con un trozo de polietileno y luego con la tapa de la caja a fin de mantener mejor la humedad (foto, pág. 146).

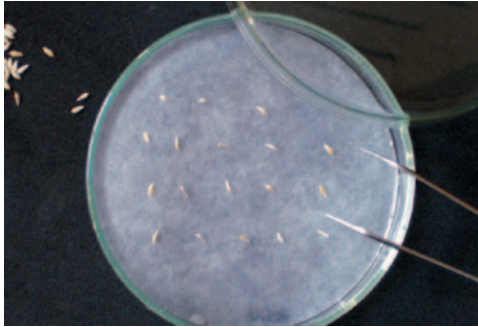


Foto. Montaje del bioensayo de lechuga y plántulas germinadas para su medición con calibre digital.

Photo. Lettuce bioassay assembly and germinated seedlings for their determination with digital caliper.

Se prepararon 9 dosis/tratamientos decrecientes entre 1.215 y 0,01215 g i.a.ha⁻¹ glifosato (formulación líquida soluble de sal amónica de la N- fosfonometil glicina al 40,5% (eq. ac. glifosato 36,9 % p/v) (tabla), con 4 repeticiones cada una y un testigo o control negativo (agua destilada) con 8 repeticiones.

Tabla. Dosis de glifosato utilizadas en g i.a.ha⁻¹ y su equivalente en L.ha⁻¹.

Table. Used glyphosate doses in g a.i.ha⁻¹ and the equivalent in L.ha⁻¹.

g i.a.ha ⁻¹	L.ha ⁻¹
0,01215	0,00003
0,1215	0,0003
1,215	0,003
3,948	0,00975
6,682	0,01650
9,416	0,02325
12,15	0,03
121,5	0,3
1.215	3

Los tratamientos se distribuyeron en bloques al azar en cámara de crecimiento ($20 \pm 1^\circ\text{C}$) con alternancia de luz (16 h) y oscuridad (8 h), durante 96 horas.

Para el bioensayo de trigo (*Triticum aestivum* L.) se procedió de igual forma que con lechuga, variando solo los tratamientos. Se prepararon 5 dosis/tratamientos decrecientes entre 12,15 y 1,215 g i.a. ha^{-1} glifosato, con 4 repeticiones y un control negativo con 8 repeticiones. Las mediciones en trigo se efectuaron a las 144 horas.

Se midió la longitud radicular de las semillas de cada tratamiento y repetición con calibre digital y se determinó el porcentaje de germinación. Se calculó el índice de germinación multiplicando el porcentaje de germinación por la longitud media de la radícula, expresados ambos en porcentaje respecto del testigo (8). Se efectuó el análisis de variancia (6). Se utilizó el test de Tukey para identificar diferencias entre los tratamientos. Para establecer las diferencias entre el control negativo con agua destilada y las distintas dosis ensayadas se empleó la prueba de Dunnett (7) de acuerdo con la fórmula:

$$DMS = d \cdot \sqrt{\frac{2 \cdot (CME)}{n}}$$

donde:

DMS = Diferencia mínima significativa

d = Valor crítico para la prueba de Dunnett de comparación de tratamientos con un control
Valor de tabla para comparaciones bilaterales $d_{0,05}$

CME = Cuadrado medio del error

n = Número de repeticiones

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Lechuga

Las dosis ensayadas permitieron ajustar una curva de tendencia negativa con un r^2 de 0,83 y r^2 de 0,86 para longitud radical e índice de germinación, respectivamente (figura 1a; figura 1b, pág. 148).

Hubo tratamientos que tuvieron un menor crecimiento radical con respecto al testigo (figura 1 a, pág. 148). Según la prueba de Dunnett, mediante la que se comparó cada tratamiento con el control negativo, los tratamientos de 0,00003; 0,0003 y 0,003 $\text{L} \cdot \text{ha}^{-1}$ de glifosato no presentaron diferencias significativas con respecto al testigo en cuanto a longitud radical ($p < 0,05$). Los demás tratamientos, en dosis creciente de glifosato, presentaron diferencias significativas con respecto al testigo (DMS = 4,785 mm).

Según el test de Tukey ($p < 0,05$), la longitud radical del tratamiento correspondiente a la CE50 (0,01650 $\text{L} \cdot \text{ha}^{-1}$) presentó diferencias significativas con respecto a los tratamientos de 0,00003; 0,0003 y 0,003 $\text{L} \cdot \text{ha}^{-1}$ y a los de 0,3 y 3 $\text{L} \cdot \text{ha}^{-1}$ de glifosato (DMS = 5,579 mm). Sin embargo, no se encontraron diferencias significativas con respecto a los tratamientos de 0,03; 0,02325 y 0,00975 $\text{L} \cdot \text{ha}^{-1}$ de glifosato. Esto indicaría que la CE50 se encuentra dentro de un rango de dosis (0,03 - 0,00975 $\text{L} \cdot \text{ha}^{-1}$ de glifosato).

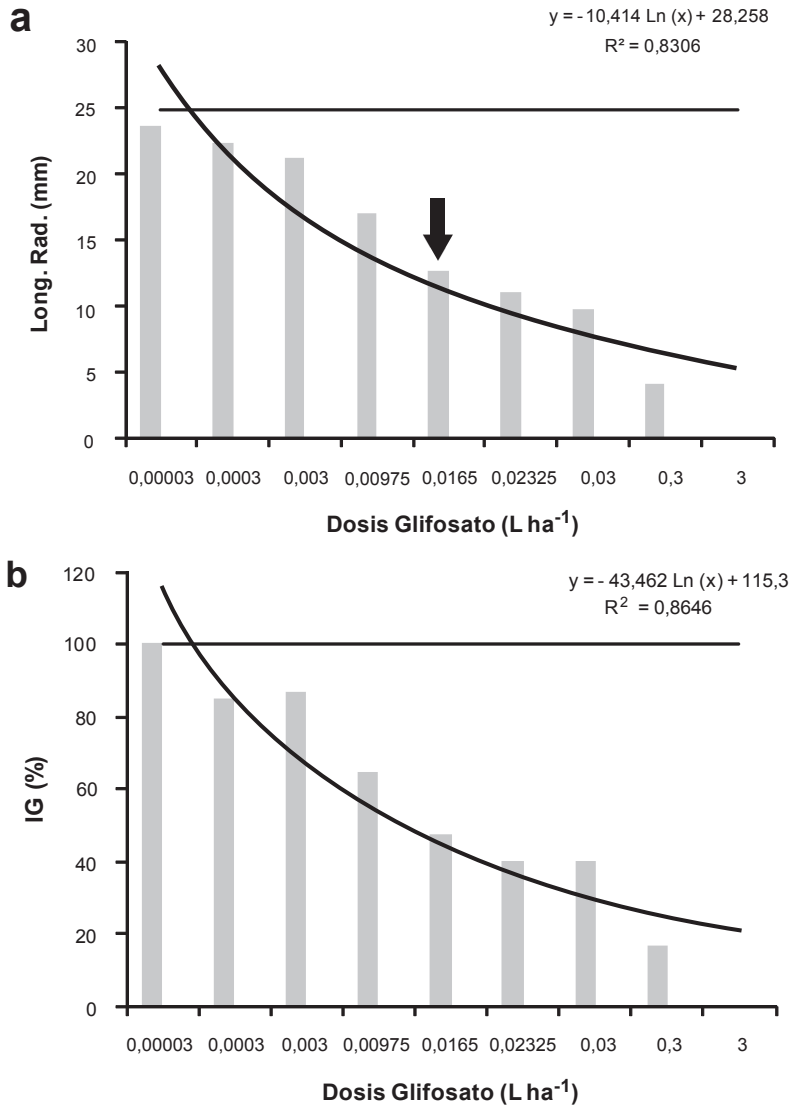


Figura 1a. Línea de tendencia obtenida relacionando la longitud radical (mm) de lechuga según dosis crecientes de glifosato. La flecha indica la dosis CE50. El testigo se graficó como una recta paralela al eje x; **1b.** Línea de tendencia del índice de germinación (IG) en % según dosis de glifosato crecientes comparados con el testigo (100%).

Figure 1a. Tendency line obtained relating lettuce root length (mm) according to increasing glyphosate doses. The arrow indicates the EC50 dose. The control treatment was represented as a straight line parallel to x axis; **1b.** Tendency line of germination index (IG) in % according to glyphosate increasing doses as compared with control treatment (100%).

Como la metodología señala que la CE50 es aquella concentración que provoca una reducción del 50% en la elongación de la raíz con respecto al testigo (12,6 mm), se determinó que la CE50 correspondió a la dosis de producto comercial de 0,01650 L. ha⁻¹ de glifosato. Esta dosis equivalente a 668,2 ppm es superior a la obtenida por Forero *et al.* (1), que fue de 31,63 ppm. La disparidad de los resultados puede explicarse en parte por el uso de una formulación y marca de producto distinta a la utilizada en este trabajo.

Forero *et al.* (1) determinaron, además, que a partir de 2,22 ppm de glifosato se comenzaban a detectar residuos en solución acuosa, manifestados en reducción del crecimiento de la radícula de lechuga.

Por otra parte, mediante cromatografía líquida de alta eficiencia, con una metodología mucho más precisa, Rodríguez (10) determinó que en muestras de agua la cantidad mínima de glifosato detectada fue de 0,0008 a 0,004 ppm y las cantidades mínimas cuantificables estuvieron entre 0,002 y 0,022 ppm. Es decir, cien veces menor a la concentración que pudieron detectar Forero *et al.* (1) mediante los bioensayos.

En un tributario del Arroyo del Pescado (Provincia de Buenos Aires, República Argentina), la concentración de glifosato medida, asociada a los escenarios de aplicación, varió entre 1,8 y 10,9 mg/l en agua sin filtrar (11), analizados también por cromatografía líquida.

De acuerdo con el índice de germinación y siguiendo el criterio de Zucconi *et al.* (14) para enmiendas, el producto se considera fitotóxico cuando el índice de germinación es inferior a 60. En el bioensayo de lechuga el índice de germinación correspondiente a la dosis CE50 fue de 47,4% (figura 1b, pág. 148), mientras que la dosis inmediata más baja presentó un índice de 64,9%.

Trigo

Todos los tratamientos tuvieron un menor crecimiento de la raíz con respecto al testigo o control negativo (figura 2a, pág. 150). Según la prueba de Dunnett todos los tratamientos presentaron diferencias significativas ($p < 0,05$) en cuanto a longitud radical (mm) con respecto al testigo (DMS = 9,207 mm). La CE50 para trigo correspondió a la dosis de 0,9416 g i.a.ha⁻¹, es decir 0,02325 L.ha⁻¹ (figura 2 a, pág. 150), la cual produjo una reducción del crecimiento de la raíz primaria del 49,7% respecto del testigo. Las dosis ensayadas permitieron ajustar una curva de tendencia negativa con un r^2 de 0,96 para longitud radical e índice de germinación (figuras 2 a y 2 b, pág. 150).

Para la longitud radical, según el test de Tukey ($p < 0,05$), el tratamiento correspondiente a la dosis de la CE50 (0,02325 L.ha⁻¹) no presentó diferencias significativas con respecto a los tratamientos de 0,03 y 0,0165 L.ha⁻¹ de glifosato. Sí se observaron diferencias significativas con respecto a los demás tratamientos ensayados (0,00975 y 0,003 L.ha⁻¹).

En el bioensayo con trigo, el índice de germinación correspondiente a la dosis CE50 fue de 50,3% (figura 2 b, pág. 150) y en la dosis inmediata más baja se obtuvo un índice de 62,1%.

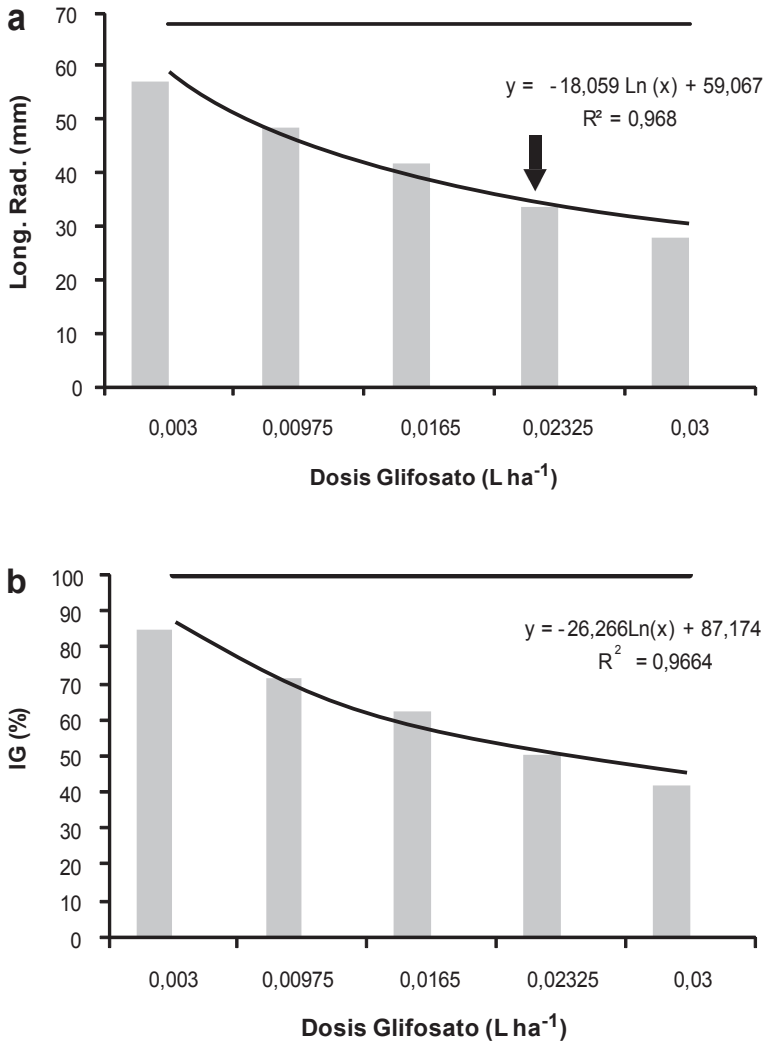


Figura 2a. Línea de tendencia obtenida relacionando la longitud radical (mm) de trigo según dosis crecientes de glifosato. La flecha indica la dosis CE50. El testigo se graficó como una recta paralela al eje x; **2b.** Línea de tendencia del índice de germinación (IG) en % según dosis crecientes de glifosato comparados con el testigo (100%).

Figure 2a. Tendency line obtained relating wheat root length (mm) according to increasing glyphosate doses. The arrow indicates the EC50 dose. The control treatment was represented as a straight line parallel to x axis; **2b.** Tendency line of germination index (IG) in % according to glyphosate increasing doses as compared with control treatment (100%).

CONCLUSIONES

Con las dosis ensayadas se pudo determinar la CE50 de una formulación de glifosato para lechuga y trigo.

Tanto *Lactuca sativa* L. var. mantecosa como *Triticum aestivum* L. resultaron sensibles a distintas dosis de glifosato empleadas por lo que podrían utilizarse como indicadores biológicos de toxicidad específica.

BIBLIOGRAFÍA

1. Forero, C.; Rodríguez P. E.; Fuentes, C. 2004. Detección de residuos biodisponibles de glifosato en aguas y suelos: Optimización de una técnica de bioensayos con plantas indicadoras. *Agronomía Colombiana*. 22(1): 63-73.
2. Foti, M. N.; Lallana V. H. 2005. Bioensayo de germinación con semillas de *Eruca sativa* Mill. para la detección de salinidad y presencia de herbicida en agua. *Revista FABICIB* (9): 9-16.
3. Foti, M. N.; Lallana, V. H. 2007. Bioensayos de germinación para detectar un herbicida hormonal en muestras de agua, vegetales y de suelo. *Natura Neotropicalis* 38(1 y 2): 69-75.
4. Günther, P.; Rahman, A.; Pestemer, W. 1989. Quantitative bioassay for determining residues and availability to plants of sulphonylurea herbicides. *Weed Research* 29: 141-146.
5. Iannacone, J.; Alvarino, L.; Caballero, C.; Sánchez, J. 2000. Cuatro ensayos ecotoxicológicos para evaluar lindano y clorpirifos. *Gayana (Concepc.)* [online]. 64 (2): 139-146. Consulta: 30-08-2011. doi: 10.4067/S0717-65382000000200003.
6. InfoStat 2002. InfoStat, versión 1.1. Grupo InfoStat. Facultad de Ciencias Agrarias. Universidad Nacional de Córdoba. Argentina. 266 p.
7. Montgomery, D. C. 1999. Diseño y análisis de experimentos. Grupo Editorial Iberoamérica. 589 p.
8. 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.
9. 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.
10. Rodríguez, H. 2001. Determinación de residuos de glifosato y de su metabolito ácido amino metilfosfónico en aguas mediante cromatografía líquida de alta eficiencia. Trabajo de Grado. Departamento de Química. Universidad Nacional de Colombia, Bogotá. p. 70-78.
11. Ronco, A. E. 2010. Impacto de plaguicidas en ambientes acuáticos pampeanos: integración de estudios químicos, ecotoxicológicos en experimentos de campo y laboratorio, con especial énfasis al caso del glifosato. *Taller aspectos ambientales del uso de glifosato*. EEA Balcarce. INTA, 23 y 24 de noviembre de 2010. p. 80-89.
12. Torres Rodríguez, M. T.; García Melián, M.; Hernández Perera, N. M.; Fernández Novo, M. 2006. Toxicidad de agua de lixiviados acuosos mediante un ensayo con *Lactuca sativa* L. *Higiene y Sanidad Ambiental* 6: 170-172.
13. Wang, W. 1991. Literature review on higher plants for toxicity testing. *Water, Air and Soil Pollution* 59: 381-400.
14. Zucconi, F.; Pera, A.; Forte, M.; De Bertoldi, M. 1981b. Evaluating toxicity of immature compost. *Biocycle* 22: 54-57.

Agradecimientos

El presente trabajo se realizó en el marco del Proyecto PFIP 2004 "Caracterización ecológica ambiental de represas para riego en Entre Ríos" y PID UNER 2111, y forma parte de los estudios preliminares del plan de tesis de doctorado de la 4^a autora, Ing. Agr. María Natalia Foti (2011).