

Implicaciones del empleo del Asulam en pastizales y su impacto en el ecosistema

MUÑOZ, A. (1); HERNANDO, F. (1); GONZÁLEZ-MURÚA, C. (1)
y SÁNCHEZ-DÍAZ, M. (2)

RESUMEN

El objetivo de este trabajo ha sido investigar el comportamiento de dos leguminosas bajo la acción del herbicida arilcarbámico, asulam, así como el impacto de este herbicida en el ecosistema acuático. Se ha estudiado el contenido de clorofilas y la respuesta estomática de Medicago sativa y Trifolium pratense a tres dosis (0,1 %, 1 % y 10 %) de asulam.

La influencia de este herbicida en el medio acuático se ha estimado a concentraciones de 1, 10 y 20 ppm, analizándose el efecto que producen en el rendimiento energético de Chlorella pyrenoidosa.

INTRODUCCIÓN

La eficacia en la producción de los pastos viene dada por la interacción de muchos factores. La fotosíntesis y la transpiración están ampliamente relacionadas con los intercambios de materia y energía entre el sistema planta y el medio.

(1) Cátedra de Fisiología Vegetal. Facultad de Ciencias. Universidad del País Vasco.

(2) Departamento de Fisiología Vegetal. Universidad de Navarra.

La competencia de las malas hierbas por los nutrientes, el agua y la luz ha impulsado al uso de compuestos químicos (BAUR y cols., 1977).

La invasión de las praderas por el *Rumex* solamente puede ser controlada por herbicidas. La existencia en esta planta de una raíz con grandes reservas motiva que para su erradicación se utilice un herbicida de translocación tal com el asulam, compuesto aril-carbámico específico de esta mala hierba (HAGGAR, 1976).

La selectividad de un herbicida se entiende por el hecho de que la mala hierba es eliminada por el compuesto químico sin afectar al cultivo. Sin embargo, no es tan evidente si esta selectividad es de tipo fisiológico o simplemente protección física del suelo; es por tanto necesario determinar si al mismo tiempo que se elimina la competencia no se altera la fisiología de la planta cultivo.

En experiencias anteriores (GONZÁLEZ-MURÚA y cols., 1980-81), se ha comprobado que el asulam reducía tanto el porcentaje de germinación como la absorción de agua en las semillas de *Medicago* y *Trifolium*, así como su posterior crecimiento.

Dado que la resistencia de las especies varía en las etapas del desarrollo, es interesante constatar si las respuestas obtenidas durante el proceso de germinación se mantienen uniformes en estadíos posteriores.

Otro de los problemas derivados de la aplicación de herbicidas es el acúmulo con el tiempo de estos productos en las aguas superficiales (DECLUIRE, 1975). Los efectos de los herbicidas en las algas, como productores primarios, aireadores y/o fijadores de nitrógeno deben ser considerados ya que la calidad y la productividad de un ecosistema, particularmente el acuático, depende del carácter de la microflora (CHRISTY, 1981).

La finalidad de este trabajo ha sido analizar el comportamiento de dos tipos de leguminosas pratentes tratadas con diferentes dosis de herbicidas. Se ha comprobado el grado de abertura estomática y el contenido de clorofilas en *Medicago sativa* y *Trifolium pratense* frente a tres dosis de asulam. Además, hemos analizado el posible impacto de este herbicida en el crecimiento y balance energético de *Chlorella pyrenoidosa*.

MATERIALES Y MÉTODOS

Semillas de *Medicago sativa* (cv. Aragón) y *Trifolium pratense* (cv. Violeta) fueron germinadas durante tres días en placas Petri conteniendo tres discos de papel de filtro y 10 ml. de agua destilada,

a $25^{\circ}\text{C} \pm 1$ de temperatura; 90 % de humedad relativa y a la oscuridad. Las semillas germinadas fueron trasplantadas a tiestos que contenían perlita y fueron regadas con solución completa (HEWITT, 1966). Las condiciones de crecimiento fueron 14 horas de luz de 25.000 lux de intensidad y 10 horas de oscuridad; la temperatura fue de $25^{\circ}\text{C}/20^{\circ}\text{C}$ día/noche, y la humedad relativa osciló entre el 50 y 60 %.

La aplicación del herbicida se llevó a cabo mediante pulverización de 1,7 ml. por tiesto, que corresponden a los 600 litros por Ha. recomendados por la casa comercial; las concentraciones del herbicida fueron de 0,1 %, 1 % y 10 % del producto comercial Asulox, correspondiente a 0,04 %, 0,4 % y 4 % de materia activa de asulam. La aplicación se llevó a cabo en plantas de 32 días.

La concentración de clorofila «a» y clorofila «b» se calculó por el método de ARNÓN (1949) en extractos acetónicos del 80 %. La abertura estomática fue estimada mediante porómetro de flujo tipo Alvim (SLAVIK, 1974).

Los ensayos se llevaron a cabo los días 0, 1, 2, 3, 4 y 7 después de la aplicación de las diferentes concentraciones de herbicida, llevándose siempre unas plantas como control (sin herbicida) en cada fecha.

Chlorella pyrenoidisa fue crecida en medio líquido (LEFEBVRE-DROUET y cols., 1978). El inóculo inicial fue de 80.000 células/ml. en fase exponencial y las condiciones de crecimiento fueron: luz constante de 5.500 lux, $25^{\circ}\text{C} \pm 1$ de temperatura y agitación constante de 120 r.p.m. (BEN-BASSAT, 1977; SHELPI y CANVIN, 1980). Las dosis de asulam estudiadas fueron de 1 ppm, 10 ppm. y 20 ppm.

La curva de crecimiento se estableció entre el conteo directo al microscopio con hemocitómetro y la D.O. a 750 nm.

La concentración de clorofila «a» y «b» se calculó por el método de LENZ y ZEITZSCHEL (1968) en extractos metanólicos. La fotosíntesis y la respiración se calcularon polarográficamente mediante electrodo de oxígeno tipo Clark (LEHOCZK y cols., 1979).

Los ensayos se realizaron durante 12 días después de la aplicación del herbicida y la fotosíntesis y respiración se llevaron a cabo el día 7.º

RESULTADOS

La concentración de clorofila fue calculada en relación al peso seco de la planta, y en la Figura 1 se expresan las cantidades obtenidas de clorofila «a» y «b» en *Medicago sativa* Aragón durante el tiempo que

duró el ensayo. Se puede observar que la proporción clorofila «a» y clorofila «b» en las plantas controles era del orden de 2,35. Cuando las plantas fueron sometidas a las concentraciones 0,1 %, 1 % y 10 % del producto comercial se observó una disminución del contenido en clorofilas que fue haciéndose menor con el tiempo llegando a registrarse inhibiciones del 35 %, 39 % y 50 % siete días más tarde de la aplicación, en el caso de la clorofila «a»; e inhibiciones del 41 %, 44 % y 51 % en los cálculos para la clorofila «b».

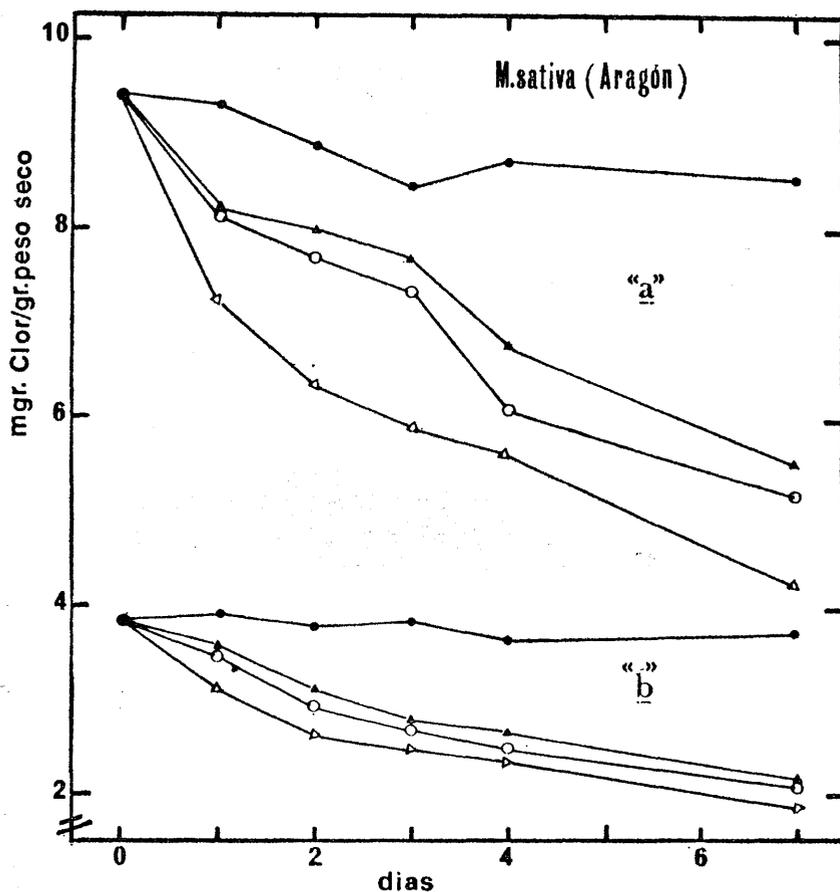


Figura 1.—Contenido en clorofilas de plantas de *Medicago sativa* Aragón tratadas con concentraciones 0,1 % (▲), 1 % (○) y 10 % (△) de asulam. El círculo (●) representa los valores de las plantas control. Cada punto es la media de tres medidas de cuatro ensayos realizados independientemente. El error estándar entre los experimentos de cada punto fue siempre menor del 10 %.

Los datos obtenidos de clorofilas «a» y «b» de *Trifolium pratense* tanto en condiciones de control como en las plantas sometidas a las diferentes concentraciones de asulam se han representado en la Figura 2. La relación existente entre clorofila «a» / clorofila «b» en las plantas no expuestas a herbicida fue del orden de 2,53. El contenido en clorofilas de las plantas tratadas fue disminuyendo con el tiempo, siendo tanto menor cuanto mayor fue la concentración del herbicida, obteniéndose una inhibición final de la clorofila «a», en el séptimo día del estudio, del 23 %, 33 % y 43 % para las concentraciones de 0,1 %, 1 % y 10 % del herbicida, respectivamente, y unas inhibiciones del 24 %, 43 % y 47 % para la clorofila «b».

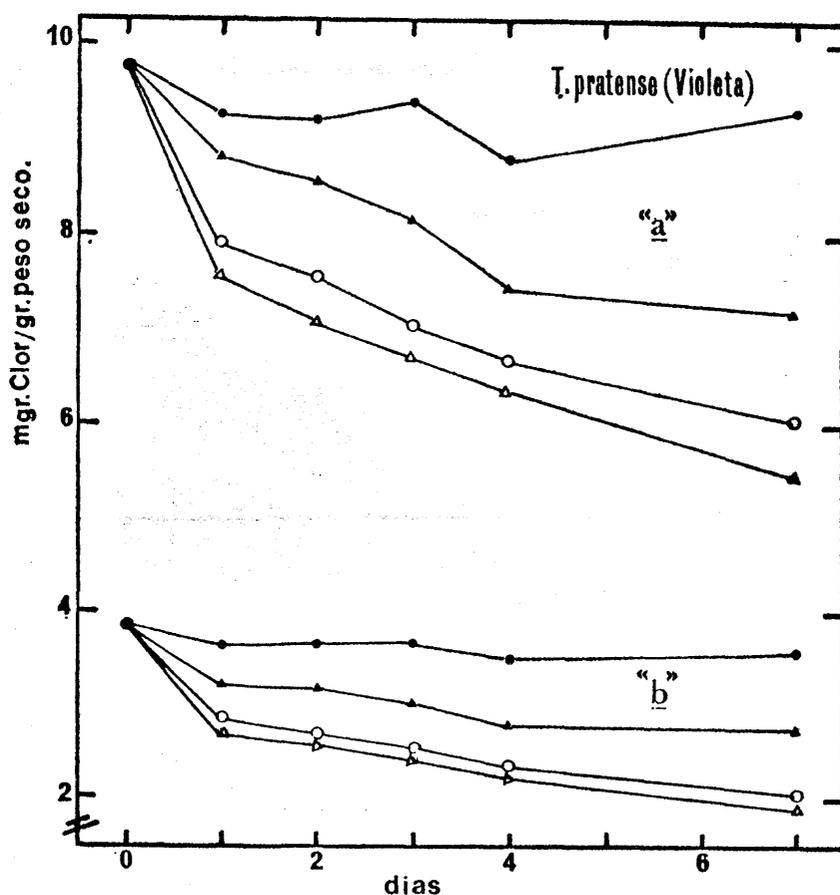


Figura 2.—Contenido en clorofilas de plantas de *Trifolium pratense* Violeta tratadas con concentraciones 0,1 % (▲), 1 % (○) y 10 % (Δ) de asulam. El círculo (●) representa los valores de las plantas control. La significación estadística de los datos como en la Figura 1.

Los valores obtenidos de la abertura estomática como conductancia al flujo de aire, se han expresado en las Figuras 3 y 4 para *Medicago sativa* y *Trifolium pratense*, respectivamente. La abertura estomática del control siguió una pauta similar durante el tiempo de ensayo siendo la conductancia del orden de $4,25 \cdot 10^{-3}$ en alfalfa (Figura 3) y de $5,25 \cdot 10^{-3}$ en trébol (Figura 4).

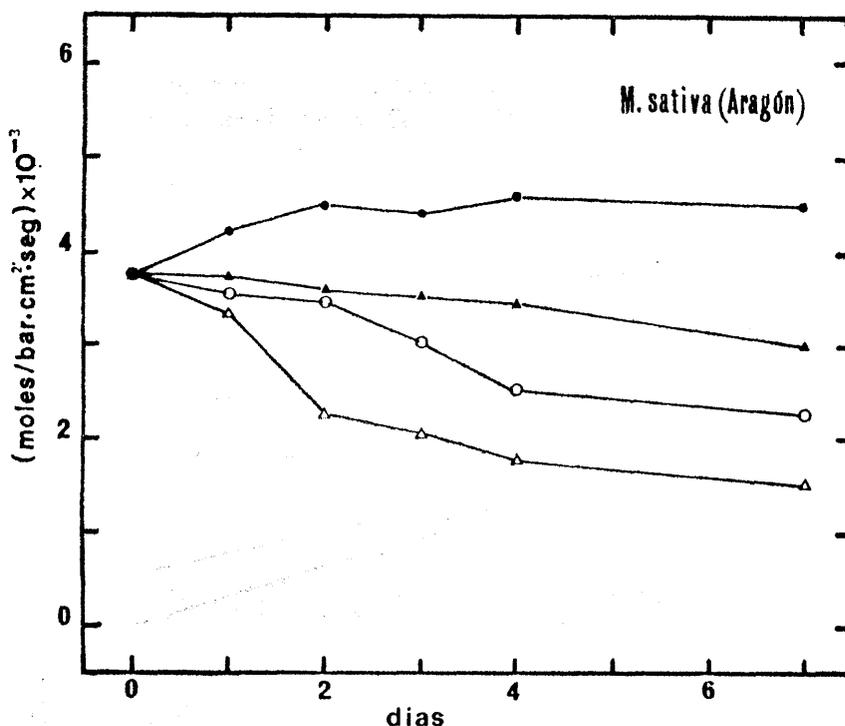


Figura 3.—Conductancia al flujo de aire de plantas de *Medicago sativa* Aragón tratadas con concentraciones 0,1 % (▲), 1 % (○) y 10 % (△) de asulam. El círculo (●) representa los valores de las plantas control. La significación estadística de los datos como en la Figura 1.

En las plantas sometidas a la pulverización de asulam se registró un cierre estomático, dando valores de conductancia al flujo de aire sucesivamente menores con el tiempo transcurrido después del tratamiento y con el aumento de las dosis empleadas. La inhibición de la abertura estomática fue, al séptimo día de estudio del 33 %, 47 % y 62 % en alfalfa (Figura 3) y del 52 %, 57 % y 71 % en trébol (Figura 4).

La influencia del asulam en el crecimiento de *Chlorella pyrenoidosa* se ha expresado en la Figura 5. Dosis de 1 ppm. no parecen afectar al crecimiento ya que se obtuvieron variaciones del orden de $\pm 5\%$. Concentraciones de 10 ppm. y 20 ppm. afectan en mayor medida, observándose que la inhibición fue sucesivamente menor en el transcurso de los días ensayados hasta el 8.º día, a partir del cual se mantuvo en un 8 % para la concentración de 10 ppm. y en un 12 % para 20 ppm.

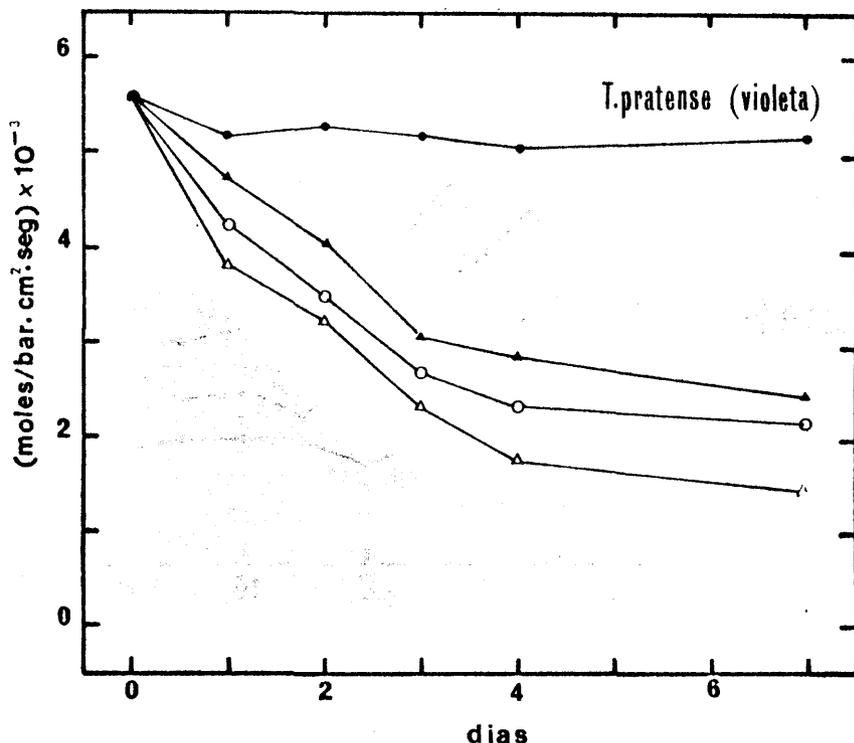


Figura 4.—Conductancia al flujo de aire de plantas de *Trifolium pratense* Violeta tratadas con concentraciones 0,1% (▲), 1% (○) y 10% (△) de asulam. El círculo (●) representa los valores de las plantas control. La significación estadística de los datos como en la Figura 1.

La concentración de clorofilas «a» y «b» expresadas por ml. de cultivo (Figura 6) y por 10^6 cels (Figura 7), fue menor que el control en todas las concentraciones de herbicida estudiadas; sin embargo, las inhibiciones disminuyeron sucesivamente en el transcurso de los días ensayados, obteniéndose inhibiciones menores del 10 % cuando la población control alcanzó la fase estacionaria.

Es interesante hacer notar que el 7.º día, que corresponde a la fase exponencial, se obtuvieron inhibiciones del orden del 2 %, 14 % y 20 % en la cantidad de clorofilas / ml. y del 2 %, 4 % y 4 % expresada en clorofilas / 10^6 cels.

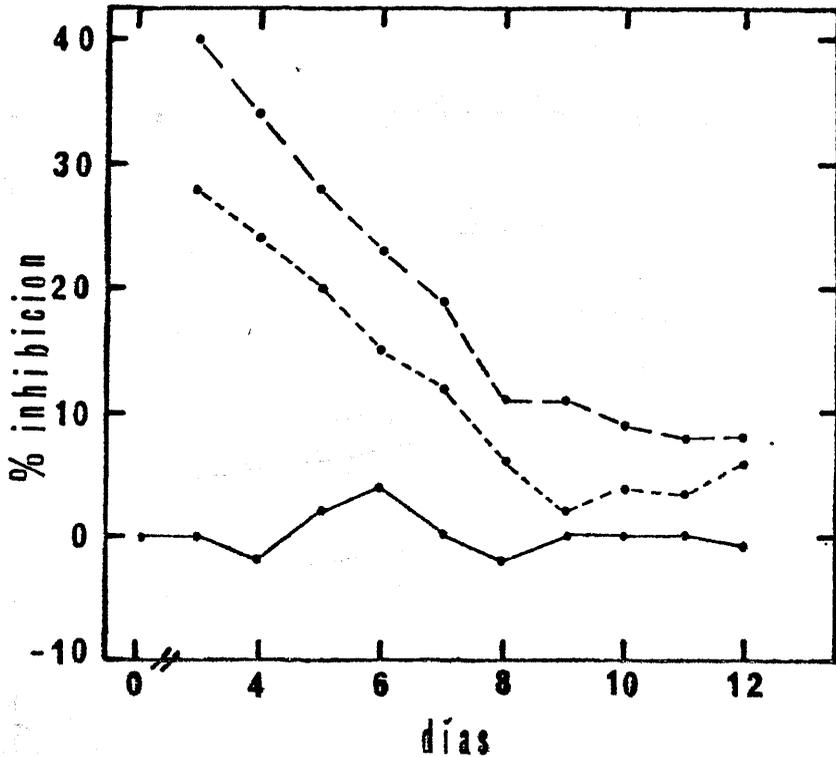


Figura 5.—Porcentaje de inhibición del crecimiento de *Chlorella pyrenoidosa* bajo la acción del asulam 1 ppm (—), 10 ppm (-.-.-) y 20 ppm (---). La representatividad de los datos como en la Figura 1.

En la Figura 8 se ha indicado el oxígeno desprendido a la luz así como el oxígeno consumido a la oscuridad en la población del alga estudiada. Ambos procesos se vieron afectados por la presencia del herbicida en el medio de cultivo, obteniéndose en todos los casos inhibiciones superiores al 10 %.

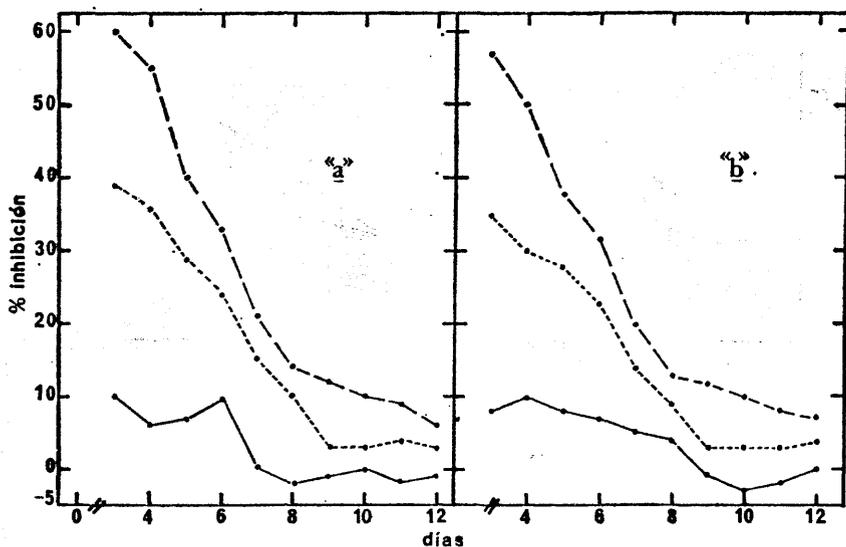


Figura 6.—Porcentaje de inhibición de la concentración de clorofila «a» y «b» expresado por ml. de cultivo de *Chlorella pyrenoidosa* bajo la acción del asulam 1 ppm (—), 10 ppm (-----) y 20 ppm (—·—). La representatividad de los datos como en la Figura 1.

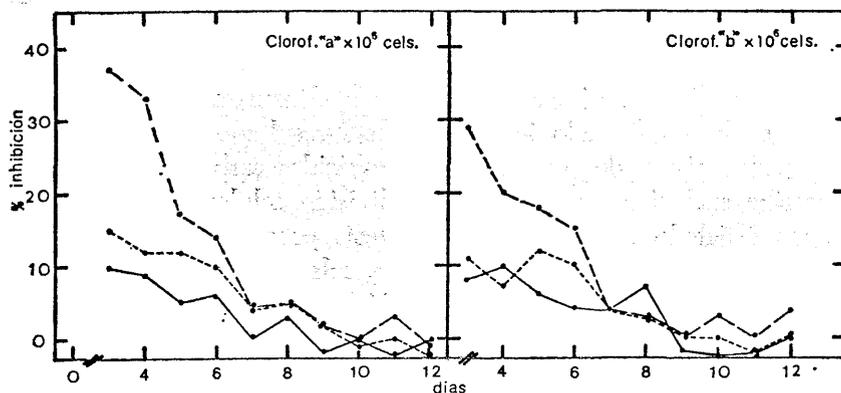


Figura 7.—Porcentaje de inhibición de clorofilas/10⁶ células en el cultivo de *Chlorella pyrenoidosa* bajo la acción del asulam 1 ppm (—), 10 ppm (-----) y 20 ppm (—·—). La representatividad de los datos como en la Figura 1.

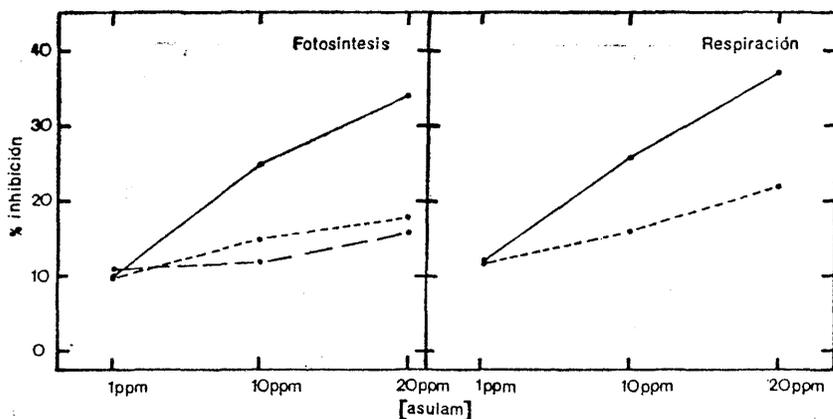


Figura 8.—Inhibición del oxígeno desprendido y del oxígeno consumido a diferentes concentraciones de asulam calculado para 1 ml. de cultivo (—), respecto a 10^6 células (-----) y el oxígeno desprendido por gr de clorofila «a» (— · —). La representatividad de los datos como en la Figura 1.

DISCUSIÓN

El crecimiento de *Chlorella* se ha visto disminuido por concentraciones de asulam superiores a 1 ppm. (Figura 5), esto es debido a que el asulam, como otros herbicidas carbámicos, ha sido considerado como veneno mitótico (CARTWRIGHT, 1979). La respuesta a las pocas horas de aplicación del tratamiento con herbicidas carbámicos es una detención de las células en la profase (TALBERT, 1965), obteniéndose células multinucleadas (BAYER y col., 1967; LIGNOWSKI y cols., 1972).

En estudios anteriores realizados con el asulam (MUÑOZ y cols., 1981) se ha confirmado igualmente este resultado.

El mecanismo de acción de los herbicidas carbámicos no se circunscribe exclusivamente a nivel de división celular ya que también se han señalado efectos sobre la síntesis proteica, fosforilización e inhibición de la reacción de Hill (DÍAZ y cols., 1981). Asimismo, nuestros resultados indican una disminución del contenido de clorofilas (Figuras 1, 2, 6 y 7) producida por el asulam; resultados similares han sido encontrados con cloropofam (ESHEL y WARREN, 1967).

Algunos autores (DODGE y LAWES, 1972; BURNS y cols., 1971) indican que el mecanismo de acción a nivel del contenido en clorofilas de algunos carbámicos como el diclormato se ejerce a nivel de biosíntesis de carotenoides, aunque se desconoce si igualmente puede

existir un efecto directo sobre la síntesis de clorofilas o una inducción de su degradación, produciendo clorosis.

Comparativamente el trébol Violeta resultó ser menos afectado en su contenido en clorofilas que la alfalfa Aragón; asimismo, esta mayor resistencia al asulam en los tréboles que en las alfalfas ha sido establecida en la etapa de germinación de estas leguminosas (GONZÁLEZ-MURÚA y cols., 1980).

A pesar de que en leguminosas (Figuras 1 y 2) el efecto del asulam es más notorio con el tiempo, en cultivos de *Chlorella* el mayor efecto del herbicida fue en los primeros días de su aplicación (Figuras 6 y 7).

Las concentraciones de asulam utilizadas han inducido cierre estomático (Figuras 3 y 4), esto puede ser la consecuencia de una serie de sucesos en cadena, desde la alteración de la composición lipídica de las membranas, atribuida a los herbicidas carbámicos (RIVERA y PENNER, 1979), hasta la carencia de ATP inducida por la disminución de pigmentos fotosintéticos y alteraciones en los procesos energéticos: fotosíntesis y respiración (Figura 8).

El hecho de que la clorofila «b» esté más inhibida que la clorofila «a» en las dos leguminosas estudiadas (Figuras 1 y 2) sugiere que el efecto del asulam sea muy importante a nivel del fotosistema II, reduciendo la cantidad de oxígeno desprendido. Esto, unido al cierre estomático encontrado (Figuras 3 y 4), pone en duda la especificidad del asulam contra *Rumex* ya que a la concentración necesaria para combatirlo se obtuvo una reducción de pigmentos y abertura estomática próximos al 50 % en las leguminosas cultivo. Además, la inhibición observada en la fotosíntesis y respiración de *Chlorella* (10 a 40 %) pone de manifiesto que puede ser potencialmente perjudicial para el ecosistema.

BIBLIOGRAFIA

- ARNON, D. I., 1949. *Plant Physiol.* 24: 1-15.
BAUR, J. R.; BOVEY, R. W. and HOLT, E. C., 1977. *Agronomy Journal.* 69: 846-851.
BAYER, D. E.; FOY, C. L.; MALIORY, T. E. and CUTTER, E. G., 1967. *Am. J. Bot.* 54: 945-952.
BEN-BASSAT, D. and MAYER, A. M., 1977. *Physiol. Plant.* 40: 157-162.
BURNS, E. R.; BUCHANAM, G. A. and CARTER, M. C., 1971. *Plant Physiology.* 47: 144-148.
CARTWRIGHT, P. M., 1979. Cap. II in Audus ed. *Herbicides: Physiology, Biochemistry, Ecology.* pp. 55-82.

- CHRISTY, S. L.; KARLANDER, E. P. and PAROCHETTI, S. V., 1981. Weed Science of American Journal. 29: 5-7.
- DECLUIRE, M.; DE CAT, W. et BASTIN, R., 1975. Revue de l'agriculture. Janvier-Février. 1: 27-38.
- DÍAZ, M. A.; CHUECA, A.; RODRÍGUEZ, I. y LÓPEZ GORGÉ, J., 1981. Anales de Edafología y Agrobiología. 40: 285-294.
- DODGE, J. D. and LAWES, G. B., 1972. Ann. Bot. 36: 315-323.
- ESHEL, Y. and WARREN, G. F., 1967. Weed. 15: 237-241.
- GONZÁLEZ-MURÚA, C.; MUÑOZ-RUEDA, A. y SÁNCHEZ-DÍAZ, M., 1980. I.T.E.A. 41: 26-33.
- GONZÁLEZ-MURÚA, C.; MUÑOZ-RUEDA, A. y SÁNCHEZ-DÍAZ, M., 1981. I.T.E.A. 42: 20-26.
- HAGGAR, R. J., 1976. Span. 19: 31-33.
- HEWITT, E. J., 1966. Sand and water culture methods used in the study of plant nutrition. 2.^a ed. Tech. Comm. 22. East Malling, Kent.
- LEFEBVRE-DROUET, E. et CALVET, R., 1978. Weed Research. 18: 33-39.
- LEHOCZKI, E.; HERCZEG, T. and SZALAY, L., 1979. B.B.A. 545: 376-380.
- LENZ, J. and ZEITZSCHEL, B., 1968. Methods in Enzymology. Vol. XXIII. Photosynthesis A.
- LIGNOWSKY, E. M. and SCOTT, E. G., 1972. Weed Sci. 20: 267-270.
- MUÑOZ-RUEDA, A.; HERNANDO, F. y SABÍN, H., 1981. XIII Jornadas de Estudio: Herbicidas en Hortofruticultura.
- RIVERA, C. M. and PENNER, D., 1979. Residue Rev. 70: 45-76.
- SHELP, B. J. and CANVIN, D. T., 1980. Plant Physiol. 65: 780-784.
- SLAVIK, B., 1974. Methods of Studying Plant Water Relations. Acad. Publishing House of the Czechoslovak. od Sciences. Prague. pp. 323-325.
- TALBERT, R. E., 1965. Proc. 18th sth. Weed Control Conf., pag. 652.

CONSEQUENCES OF USAGE OF ASULAM IN GRASSES AND ITS IMPACT ON THE ECOSYSTEM

SUMMARY

The aim of this work was to investigate the behaviour of two legumes under the action of an a-ryl-carbamate herbicide: asulam; as well as its impact in the aquatic ecosystem. The chlorophylls contents and stomatal response of *Medicago sativa* and *Trifolium pratense* under three doses (0.1 %, 1 % and 10 %) of asulam was investigated.

The consequences of this herbicide in the aquatic medium have been estimated at 1, 10 and 20 ppm, analyzing the effect produced in the energetic performance of Chlorella pyrenoidosa.