**Evaluación del potencial mutagénico de biocidas (vertimec y pentacloro) sobre cebolla**

**Evaluation of the mutagenic potential of biocides (vertimec and pentachloro) on onion**

Título corto: **Genotoxicidad en *Allium cepa* producida por biocidas.**

Alfredo M. Berrocal1\*, Raúl H. Blas1, Joel Flores1, María A. Siles2.

1Laboratorio de citogenética y biología molecular del instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Agraria la Molina,Apartado 456 Lima 1, Perú.

2Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Av. Universitaria /Av. Germán Amézaga s/n, Lima 1, Perú.

\*Correspondencia: Blgo Alfredo Miguel Berrocal Huallpa, Alfredo.bh17@gmail.com  
 Blga María Angélica Siles Vallejos, mariansi@hotmail.com

**Resumen**

El uso de biocidas es una constante en el campo agronómico, el daño ocasionado a los cultivos y por consiguiente el gran potencial de daño para los consumidores es conocido, sin embargo su uso sigue en marcha. Por ello se realizaron pruebas citogenéticas para la observación de aberraciones cromosómicas en *Allium cepa,* usando muestras de raíces de plantas expuestas y no expuestas a biocídas. Los tratamientos se realizaron con el objetivo de comparar el grado de afectación de los biocídas sobre la mitosis y la ocurrencia de mutaciones cromosómicas. El ANOVA para los datos de desarrollo radicular al finalizar la experimentación, mostraron un CV de 9.88, se observo diferencias significativas entre el control y los tratamientos, los porcentajes de inhibición llegaron a tener valores máximos de 84.2% para vertimec X8 y 76.5% para pentacloro X8, y valores mínimos de 38.2% para vertimec X0.5 y 43.8% para pentacloro 0.5 X. El índice mitótico fue mayor para el control (0.193) y menores para el tratamiento con menor desarrollo radicular, vertimec X8 (0.021) y pentacloro X8 (0.028). Las pruebas citogenéticas mostraron la ocurrencia de anomalías en el ciclo celular siendo la más frecuente la C-mitosis. Se puede concluir que el test *Allium* es un buen indicador de citotoxicidad y genotoxicidad. Los biocidas ocasionan cambios en la estructura genómica de un cultivo, estos cambios podrían acumularse y ocasionar cambios de expresión génica, pudiendo dañar regiones de interés agronómico para una especie y afectar su estabilidad genética.

**Palabras clave:** test *Allium*, anomalía mitótica, estabilidad genética, genotoxicidad, citotoxicidad.

**Abstract**

Use of biocides is a constant in the agronomic field, the damage to crops and therefore the potential for harm to consumers is known, however its use is ongoing. Therefore, tests were performed to observe cytogenetic aberrations in *Allium cepa* using plant root samples exposed and not exposed to biocides. Treatments were performed in order to compare the degree of impact of biocides on mitosis and the occurrence of chromosomal mutations. The ANOVA for root development data at the end of the experiment showed a CV of 9.88, significant differences was observed between control and treatments; the inhibition percentages have reached maximum values ​​of 84.2% for Vertimec X8 and 76.5% for pentachloro X8, and minimum values ​​of 38.2% for Vertimec X0.5 and 43.8% for pentachloro X0.5. The mitotic index was higher for control (0.193) and lower for treatment with less developed root Vertimec X8 (0.021) and pentachloro X8 (0.028). Tests showed the occurrence of cytogenetic abnormalities in the cell cycle being the most frequent C-mitosis. It can be concluded that the *Allium* test is a good indicator of cytotoxicity and genotoxicity. Biocides cause changes in the genomic structure of crops; these changes may accumulate and cause gene expression changes, can damage agronomic interest regions for a species and affect their genetic stability.

**Key words:** *Allium* test, mitotic abnormalities, genetic stability, genotoxicity, cytotoxicity

**Recibido:** abril 17 de 2013

**Aprobado:** junio 18 de 2013

**Introducción**

La aplicación de biocídas en los cultivos vegetales de importancia económica para el país, es una práctica común frente a problemas de enfermedades y plagas, sin embargo a pesar de ser conocidos sus efectos tóxicos en diferentes grados, dependiendo de diversos factores, se sabe que muchos de estos provocan alguna alteración a nivel del ADN, y esto puede ser expresado a nivel citológico ( Palani, 2007), como un fallo en la maquinaria mitótica la cual a su vez es observada con una disminución del índice mitótico y alguna anomalía en los cromosomas ( Grant, 1982) como por ejemplo la presencia de puentes anafásicos, C-mitosis, deleciones, translocaciones y fragmentos aberrantes productos de algún daño en la mitosis (Rank, 2003).

Además de los efectos agudos y crónicos ya descritos, existen otros efectos de los biocidas que se presentan a muy largo plazo en la población o bien se manifiestan en otras generaciones. Estos efectos se derivan de la exposición continua a dosis bajas de una sustancia y pueden incluir una gran variedad de alteraciones bioquímicas, fisiológicas y morfológicas. Entre los más importantes se encuentran la aparición de mutaciones (Olufunsho, 2010). Comprobar la capacidad toxicológica de un compuesto es muy difícil, en particular a concentraciones normales de uso y sobre todo el detectar los niveles de concentración que se requieren para inducir mutaciones, en este aspecto muchas mutaciones que a determinadas dosis no se manifiestan se van acumulando y por consiguiente van desestabilizando la configuración genómica normal. Parte del problema radica en que en estos casos, no se puede establecer claramente la relación dosis-efecto y, por lo tanto, no es posible fijar un valor o dosis mínima capaz de provocar alteraciones. Por lo mismo, tampoco se puede establecer una concentración que sea “segura”. Por otra parte, la especificidad de los compuestos hacia cada especie en particular dificulta relacionar los efectos que causan las sustancias químicas en las plantas con los que podrían causar en el hombre. Aun así se debe considerar que los agentes químicos que generan mutaciones, o cualquier efecto tóxico sistemático en plantas de experimentación (Grant, 1994), teóricamente también tienen la capacidad de causar efectos en los seres humanos.

El test de *Allium cepa* viene siendo usado para el diagnóstico de toxicidad de diferentes compuestos tanto farmacéuticos, alimenticios y contaminantes (Frainer *et al*., 2006; Konuk, 2007; Olusegun *et al.,* 2010), esto debido a que fácilmente se pueden distinguir algunas anomalías cromosómicas, producto de un agente mutagénico, en consecuencia el obtener un diagnóstico citogenético (Ragunathan *et al*., 2007). Frente a la utilización de biocídas en cultivos de importancia agronómica, la utilización del test de *Allium* *cepa* permite obtener un buen registro de la ocurrencia de estas anomalías (Grant, 1982 y Rank, 2003); existen muchos trabajos que aprovechan la facilidad de identificar efectos genotóxicos debido a diferentes contaminantes biológicos ambientales (Ukaegbu *et al*., 2009). El test de *Allium cepa* aprovecha la consecuencia de la disminución del índice mitótico, expresada en el menor desarrollo radicular, observando así diferencias significativas entre compuestos a distintas concentraciones, y tiempos de exposición (Fiskesjo, 1985).

El uso del test de *Allium cepa* permite determinar la toxicidad de muchos compuestos por su gran sensibilidad (Fiskesjo, 1988) es por ello que en la actualidad se viene usando para monitorear el grado toxicológico de distintos compuestos como el azufre, magnesio, boro, cromo, pesticidas, herbicidas, farmacéuticos entre otros (Fiskesjo, 1993, Peña *et al.,* 1999; Espinoza *et al.,* 2007; Feretti *et al.,* 2007; Shukla *et al*., 2002; Tartar *et al*., 2006; Grant, 1978; Mustafa *et al.*, 2008). El test de *Allium cepa* además, es usado en programas de biorremediación (Srivastava *et al.,* 2005), y también podría usarse en estudios de conservación.

**Materiales y Métodos**

*Materiales biológicos, equipos y reactivos*

Como material biológico se usaron 55 bulbos de cebolla (*Allium cepa*), se seleccionaron bulbos de cebolla de aproximadamente 100 gramos, secos y sin formación de hojas y/o raíz. Los bulbos fueron limpiados mediante la eliminación de la epidermis seca y remoción de los restos de tejido y raíces secas, sin dañar las raíces primordiales. Adicionalmente se usaron 24 bulbos de cebollas con las mismas características, para determinar la hora adecuada de corte de ápices radiculares. Los reactivos para citogenética fueron fijador carnoy (Etanol: ácido acético (3:1)), HCl 1N, solución Targa, Orceína acética (2%).

*Instalación del diseño experimental*

Previo al diseño experimental se determinó la hora adecuada de corte de ápices radiculares, en un ambiente oscuro y con 26º C condicionado para el experimento, en el intervalo de 7.00 am a 1.00 pm. En el experimento se utilizó agua dura para el tratamiento control, así como para la preparación de las diluciones de los biocídas vertimec (Vertimec - Syngenta) y pentacloro (Pentacloro Saume). Se realizo la dilución en forma secuencial, obteniendo así las siguientes concentraciones: 0.5x, 1x, 2x, 4x y 8x para cada biocida (1X representa la dosis de uso recomendada). Las pruebas se realizaron en frascos de ensayo de 12 cm de longitud x 5 cm de diámetro. Se rotularon los frascos con V0.5, V1, V2, V4, V8 para vertimec, P0.5, P1, P2, P4, P8 para pentacloro y C para el control, todos con 5 replicas, siendo un total de 55 unidades experimentales. El ensayo se inició con el llenado de los frascos con cada una de las diluciones y controles; este llenado se hizo cerca al borde del frasco. A continuación se colocaron los bulbos sobre la boca del frasco, cuidando que la zona radicular quedara inmersa en el líquido. Las evaluaciones se hicieron a los 3, 6, 9 y 12 días de exposición, y en cada periodo de evaluación se midió todas las raíces emergentes y se calculó el promedio, el cual representó el valor de la medición para dicha unidad experimental (valores extremos se descartaron). Para obtener el porcentaje del efecto de inhibición se realizó la siguiente operación:

|  |  |
| --- | --- |
| Coeficiente de Inhibición (CI) = [(Lc - Lt)/Lc]x100% | |
| Lc: longitud del control | Lt: longitud del tratamiento. |

Con los valores de inhibición se construyo una gráfica de concentración versus porcentaje de inhibición y se calculó el CI50 (concentración que produce el 50 % de reducción en la longitud de raíz). Diseño experimental utilizado fue el DCA (diseño completamente aleatorio) adaptado para el *test Allium* (Fiskesjo, 1985). Para analizar los datos obtenidos se utilizó el paquete estadístico SAS 9.2 que permitió hacer el análisis de varianza y pruebas de comparación de medias como Duncan y Dunnett's.

*Análisis citogenético*

Al finalizar el periodo de exposición se retiraron todos los bulbos de los tratamientos a frascos con agua potable por una hora, luego se procedió con la tinción cromosómica de la manera que sigue: se cortaron ápices radiculares de 1-2 mm de longitud, se colocaron en una luna de reloj y se agregó la solución fijadora durante 15 minutos(a más tiempo). Se colocaron las raíces en acido clorhídrico 1N durante 10 min. Se agregó 1 a 2 gotas de la solución Targa y se mantuvo la muestra en esta solución durante 15 min. Se cortaron las raíces en secciones transversales al eje mayor de la raíz y fueron colocadas sobre una lámina. Se añadió 1 o 2 gotas de orceína acética al 2% durante 17 min. Luego se colocó una laminilla en 45º y se realizó el *squash.* Finalmente se extendió la muestra por golpeteo con la punta del lápiz. Se observó al microscopio tratando de identificar células que se encuentren en mitosis y fases mitóticas con anomalías (observación a 10x, 40x y 100x).

*Calculo del índice mitótico*

Los diferentes índices fueron obtenidos de la siguiente manera: el índice mitótico IM= (Número de células en división/ número de células totales); y los indices de Fase: IFp= (células en profase/células en división), IFm= (células en metafase/células en división), IFa= (células en anafase/células en división), y IFt= (células en telofase/células en división).

**Resultados**

*Hora adecuada de corte de ápices radiculares*

El monitoreo de la hora adecuada para el corte de ápices de raíz en cebolla, fue entre las 9 -11 de la mañana, en las condiciones del laboratorio (oscuridad y 26º C), teniendo como índice mitótico a 17% en promedio. Por lo tanto en la experimentación usando tratamientos con biocidas se realizaron cortes de ápices radiculares entre las 9 y 11 de la mañana, lo que permitió poder trabajar adecuadamente las 55 unidades experimentales.

*Resultados del análisis estadístico*

El coeficiente de variación (CV) para la primera medición resulto superior a 10, por consiguiente el análisis de varianza y comparación de medias no eran estadísticamente aceptables. Conforme se hicieron la segunda y tercera medición se obtuvieron valores de CV (coeficiente de variación) cercanos a 10, es decir, en cada medición siguiente el CV fue disminuyendo, mostrando diferencias significativas entre los tratamientos y agrupamientos estadísticamente aceptables (figura 1). El análisis de varianza del ensayo para la última medición con 10 grados de libertad, con 5 repeticiones por tratamiento, con 0 unidades perdidas y un alfa= 0.01 para el análisis de agrupamiento mostró diferencias significativas entre los tratamientos y un CV de 9.88, siendo estadísticamente aceptable el experimento realizado. La comparación de medias mediante Duncan (alfa= 0.01) muestra cinco grupos distintos (A: control; B: V0.5 y P0.5; C: V1, V2, P1 y P2; D: V4, P4 y P8; E: V8), el tratamiento V8 presenta menor tamaño de raíz, 1.96 cm, los tratamientos V1, V2, P1, P2 no muestran diferencias significativas en el tamaño de raíz (tamaño promedio 5.5 +/- 0.4 cm) y el control el mayor tamaño, 12.42 cm. Mediante Dunnett´s (alfa= 0.01) se observó que el control es distinto a los demás tratamientos, teniendo una diferencia menor entre medias con los tratamientos V0.5 (4.7cm) y P0.5 (5.4cm), y mayor diferencia de medias con los tratamientos V8 (10.5cm) y P8 (9.5cm), sin embargo todos los tratamientos son estadísticamente muy diferentes al control.

*Coeficiente de inhibición (CI)*

El coeficiente de inhibición para los tratamientos con biocidas tuvo valores mínimos de 0.382 para V0.5 y 0.438 para P0.5, y valores máximos de 0.842 para V8 y 0.765 para P8 (ver tabla 1). Con base en los diferentes coeficientes de inhibición obtenidos para las distintas concentraciones probadas se calculó el CI50para cada tipo de biocida, teniendo un CI50 de 0.91 para vertimec (figura 2) y un CI50de 0.78 para pentacloro (figura 3). En ambos casos, valores cercanos a la dosis recomendada para su uso (P1 y V1).

*Resultados del análisis citogenético*

La tinción cromosómica fue satisfactoria, ya que permitió diferenciar las distintas etapas del ciclo celular normal (figura 4), además permitió reconocer alguna anomalía en el ciclo de división celular.

*Índices mitóticos*

Contabilizado el número de células en mitosis y el número de células en total, se hallo el IM (índice mitótico), teniendo como índice mayor al tratamiento control, 16.39%, y menores índices para los tratamientos P8 y V8, 2.8% y 2.1% respectivamente (tabla 1). Se calculó también el coeficiente de inhibición mitótica para cada tipo de biocida y resultó que los índices para los tratamientos P1 y V1 correspondientes a la dosis normal de uso, representan el 55 % de inhibición mitótica (tabla 1 y 2), esto muy relacionado al coeficiente de inhibición media para el tamaño de raíz.

*Presencia de anomalías*

Se observó la presencia de anomalías en el ciclo celular producido por la toxicidad de los biocidas, observándose distintos tipos de aberraciones o anomalías cromosómicas dentro de las distintas etapas del ciclo celular. En la figura 5 y 6 se observan las anomalías más comunes encontradas, en el tratamiento V0.5 se observa un puente anafásico (i), en el tratamiento P0.5 una célula binucleada con un núcleo en interfase y otro en profase (h) y una c-mitosis (m), en el tratamiento V1 una c-mitosis (b) y un puente anafásico (j), en el tratamiento P1 una C-mitosis (a), células alargadas y un fragmento cromosómico aberrante (n) y una anomalía en la anafase por el huso mitótico desorganizado (o), en el tratamiento V2 una célula binucleada y una célula en telofase posiblemente binucleada (c) y varias fusiones cromosómicas que podrían ser múltiples puentes anafásicos (g), en el tratamiento P2 una célula binucleada (d) y una c-mitosis (k), en el tratamiento V4 un puente anafásico (f), en el tratamiento P4 un fragmento cromosómico aberrante candidato a formar micronúcleo (e), y en el tratamiento P8 células alargadas y presencia de fantasmas celulares (l). Para los tratamientos V8 y P8 muchas células estaban fragmentadas y eran de mayor tamaño, difícilmente se observo una anomalía. Según lo observado las anomalías más frecuentes eran la C-mitosis y anomalías en anafase, adicionalmente cambios en la forma celular.

**Discusión**

The pesticides have broad spectrum of activity withresidual effects and wide use in agriculture aThe studies about the effect of different pesticidLos estudios realizados sobre el efecto de los diferentes biocidasfound out some of the genotoxic effects on plants (Tartar demuestran algunos efectos genotóxicos en las plantas (Tartaret al., 2006). *et al.,* 2006). This study was undertaken to evaluate the El presente estudio evaluó efectos genotóxicos, citológicos inducidos por ethion on root meristem cells of A. cepa. dos biocídas en células meristemáticas de raíz de *A. cepa*. The changes on El diseño experimental reflejo una disminución del desarrollo radicular asociado a la mayor concentración de los biocidas en los tratamientos, y este menor desarrollo radicular está directamente relacionado con la inhibición de la mitosis normal en las células meristemáticas de la raíz (tabla 1). Estos cambios en mitotic activities like mitotic index, phase indices and actividades mitóticas como el índice mitótico, los índices de fase mitótica y induction of chromosomal abnormalities appeared in varying la inducción de anomalías cromosómicas aparecieron en diferentesdegrees depending on the dose and duration of treatment grados, dependiendo de la dosis o(ver tabla 1, 2 y 3; figura 5 y 6).The changes of mitotic activity in plant The inhibition ofLa alteración delmitotic index may be due to the interference of ethion in índice mitótico puede ser debido a la interferencia del biocida enthe normal process of mitosis by reducing the number of el proceso normal de mitosis, reduciendo el número dethe dividing cell (Ghareeb and George, 1997; Badr, células que se dividen (Ghareeb y George, 1997; Badr1983)., 1983). OMany other investigations were attributed to depression of mitotic activity due to the inhibition oftras investigaciones atribuyen la depresión de la actividad mitótica a la inhibición de protein synthesis (Kim and Bendixen, 1987). la síntesis de proteínas (Kim y Bendixen, 1987). La inhibiciónMitotic mitóticainhibition could also be due to the inhibition of DNA también puede ser debido a la inhibición de lasynthesis which is considered as one of the major síntesis de ADN, lo que se considera como uno de los principalesprerequisites for cell to divide (Badr, 1983). requisitos previos para que la célula se divida (Badr, 1983). However, Sin embargo,Chand and Ray (1981) reported that the reduction of Chand (1981) informó que la reducción de laoxidative phosphorylation resulting in lowered ATP level fosforilación oxidativa que resulta en un bajo nivel de ATPin the cell could be the other factor of inhibition of DNA en la célula podría ser otro factor de inhibición de la and RNA synthesis in herbicide treated plsíntesis de ADN y ARN en las plantas con tratamiento de biocidas. Furthermore, Por otra parte,Wuu and Grant (1967) reported that pesticides in a Wuu y Grant (1967) informaron que los pesticidas en lacell may exert some fundamental effects on enzyme célula pueden ejercer algún efecto sobre la función fundamental de una enzima; la producción, la inducción, la represión o la inhibición por retroalimentación podría ser una posible razón de la disminución del índice mitótico.In this report, the mitotic index En esta investigación, el índice mitóticodecreased with increasing concentrations and duration of disminuyó con el aumento de las concentraciones y la duración de los tratamientos (tabla 1 y 2). Este resultado sugiere que los biocídas utilizados causan cambios citológicos e inducen una amplia gama de anomalías mitóticas en las células del ápice de raíz de *A. cepa*. treatment of ethion (Table 1).Se ha obtenido resultados similares después de tratar a células meristemáticas de raíz de *Allium cepa* *cepa*root cells with insecticides and pesticides (Ajay andcon insecticidas y pesticidas (Ajay ySarbhoy, 1987; El-Khodary et al., 1989). Sarbhoy, 1987; El-Khodary *et al.*, 1989). However, the Sin embargo, se observo unvalue of prophase index increased with increase in the aumento del índice de profase asociado a la disminución del índice mitótico conforme aumenta laconcentration of solution as well as duration of treatment concentración de los tratamientos con biocidasexcept for few groups (Table 1). (tabla 2),This may be attributed to se puede atribuir athe prolongation of prophase stage affecting the spindle la prolongación de la etapa de profase que afecta el eje deformation by the pesticides solution. formación metafásica por presencia de biocidas.This prophase accumulation Esta acumulación de profaseswas similar to that observed by El-khodary et al. fue similar a lo observado por El-Khodary *et al*.,(1989) and Prasad and Das (1977). (1989) y Prasad y Das (1977), According to them,según ellos, el prophase poisoning is the stage in which the el el entered into mitosis but were arrested in the prophaseenvenenamiento de las células ocurre en la etapa en que entran en mitosis, siendo detenidos en la profaseresulting in high frequency of prophase cell.However, Por tantothe result shows that the metaphase, ana-telo los resultados muestran lThe decreaa disminuciónin metaphase and anatelophase indices with concentration en los índices de metafase, anafase y telofase con el aumento de la concentración (tabla 2)and duration of treatment may be due to prolonged, debido a una prolongadaprophase or the dividing cells blocked in prophase and do profase o las células en división bloqueadas en profase que no permite entrar en las siguientes fases.Abnormalities were observed in all the mitotic phases of El análisis citogenético mostro un valor de 0.03 para la frecuencia media de anomalías en células mitóticas de los tratamientos con biocidas (tabla 3). La frecuencia de anomalías poco a pocoincreases with the duration of treatment and concentration aumenta con la duración del tratamiento y la concentraciónof ethion (Table 2). de biocídas (tabla 3).Stickiness, abnormal disturbed Trastornos anormales deprophase, disturbed metaphase and anaphase were the profase, metafase y anafase fueron losmain types of anomalies observed. principales tipos de anomalías detectadas. Se presentaron eventos como la formación deBeside these bridges, puentes,laggards, delayed cytokinesis, metaphase with l retrasos en la citocinesis, metafase con chromosome, diagonal phase, binucleated interphase cells cells and unequal cytokinesis were also obsecromosoma retrasado, células binucleadas en interfase y citocinesis desigual.Similar Similaresabnormalities recorded with treatment of fluorochloridone anomalías fueron registradas con el tratamiento de fluorochloridoneon *A.* en puntas de raíces de *A.* *cepa* root tips (Yuzbasioglu et al., 2003). *cepa* por Yuzbasioglu *et al*., (2003) y tratamiento con el insecticida Ethion en puntas de raíces de *A.* *cepa* root tips (Yuzbasioglu et al., 2003). *cepa* por Kabir *et al.*, (2010).The mo Profases con cromosomas anormales e irregulares fueronreported by EI-Khodary et al. reportados por El-Khodary *et al*., (1990; 1989) in *A.*(1990, 1989) en raíces de *A.* *cepa* *cepa*roots treated with herbicide Tribunil and Garlon-4. tratadas con herbicida Tribunil y Garlon-4, donde la cantidad de anomalías en Thpercentage of the disturbed metaphase was higher thametafase fue superior a la ocurrida en anafase.the disturbed anaphase (data not shown).These Estasabnormalities could also be explained by the failure of the anomalías también podrían explicarse por una alteración en la organización del huso,spindle apparatus to organize and function in a nway and caused an irregular orientation of chromosom causando una orientación irregular de los cromosomas(Grant, 1978; Mansour, 1984). (Grant, 1978; Mansour, 1984).Another prominent anomaly Es preciso señalarobserved was the sticky nature of chromosomes which la naturaleza pegajosa de los cromosomas quecould be due to delay in chromosomal movement. dan cAs aomoresult, the chromosomes could not reach the poles and resultado, cromosomas que no pueden llegar a los polos yremained scattered in the cytoplasm and appeared permanecen dispersos en el citoplasma, presentándose de modocondensed and sticky (Ajay and Sarbhoy, 1988). condensado y pegajoso (Ajay y Sarbhoy, 1988).However, Klasterska et al. Sin embargo, Klasterska *et al.*, (1976) suggested that chromosomal(1976) sugiere que la rigidez de los cromosomasstickiness arose due to improper folding of surgió debido a la doblez impropia dechromosome fibers into single chromatid and thus there fibras de los cromosomas en una sola cromátida y por lo tanto sonis an intermingling of fibers, making chromosomes t una mezcla de fibras, lo que hace a los cromosomasbecome attached to each other by means of subchromatid adherirse el uno al otro por medio debridges. puentes de cromatina.The most common type of aberration in the El tipo más común de anomalía en elpresent study was C-metaphase induced by high dose of presente estudio fue C-metafase o c-mitosis inducida por vethion.ertimec y pentacloro.According to Nagl (1970), treatment of insecticides De acuerdo con Nagl (1970), el tratamiento con insecticidasto the roots caused blockage of the cell cycle at a las células meristemáticas de raíces causa el bloqueo del ciclo celular enmetaphase which subsequently results into C-metaphase. metafase que posteriormente resulta en C-metafase.The most observed type of aberrations in anaphase cells El tipo más observado de aberraciones en células en anafasewas precocious anaphase. es la anafase precoz.Precocious arms and La precocious chromosomes formation could formación de cromosomas precoces puede ser causada por lastickiness of chromosomes (Kaur and Grover, 1985). rigidez de los cromosomas (Kaur y Grover, 1985).Other interesting abnormalities were bridges, sticky Otras anomalías interesantesbridges and chromosomal bridges which were observed son los puentes cromosómicos que se han observadofrequently in the different treatments. con frecuencia en los diferentes tratamientos (figura 5 y 6), eThis could be duesto podría ser debido ageneral stickiness of chromosome breakage and reunion uniones por roturas cromosómicas generales(Tomkins and Grant, 1972; Badr, 1983). (Tomkins y Grant, 1972; Badr, 1983).The present observation revealed that the insecticide

Sería interesante evaluar la frecuencia de la variación genética debido a biocídas en un curso de tiempo prolongado en un ensayo de campo. Sin embargo está claro que la frecuencia de la variación dependerá del cultivo. Estos resultados sugieren que puede haber una región específica en el genoma de cebolla, que es extremadamente susceptible a la mutación generada por las condiciones de citotoxicidad por biocidas. Parece posible que las mutaciones inducidas por biocidas, en algunos casos, se asemejan a las mutaciones somáticas que tuvieron lugar en la naturaleza y deben haber llevado a la formación de las diferentes variedades de especies vegetales, aunque estas hipótesis requieren una mayor investigación rigurosa. Sin embargo es preciso señalar que en el presente estudio no se observaron anomalías en los tratamientos control.

Es un hecho bien documentado que *Allium cepa* expuesto a sustancias toxicas genera condiciones de estrés genómico que podrían resultar en roturas cromosómicas. Muchos estudios han indicado que las posiciones de ruptura no parecen ser al azar sino que se producen en una región de heterocromatina y podrían llevar a los cromosomas a una translocación, inversión o eliminación (Benzion y Phillip, 1988; Lapitan *et al*., 1988). En *Allium sativum*, estas regiones de heterocromatina se encuentran en las regiones proximales del satélite de los cuatro cromosomas que llevan la región de organización nucleolar y tienen la constricción secundaria (Sato y Kawamura, 1981). Sería interesante identificar estas regiones en otros cultivos y caracterizarlo molecularmente a fin de determinar si involucran perdida de genes favorables para la especie vegetal.

**Conclusiones**

La presente investigación reveló que los biocídas usadosethion exerts a mitodepressive effec ejercen un efecto mitodepresivo en las células del meristemo de la raízcells of *A.* de *Allium cepacepa* It has capability of producing variety of; teniendo la capacidad de producir mutants, chromosomal aberrations and toxic effects aberraciones cromosómicas y efectos tóxicos athe long run, even below the recommended do largo plazo.Such La presencia de cambios a nivel citogenético, se observó incluso en dosis por debajo de la dosis recomendada. La dosis recomendada de uso, es similar al CI50 para cada biocida, sin embargo esta produce anomalías en el ciclo celular. Tanto el CI50 y la inhibición mitótica al 50% coinciden con la dosis recomendada de uso V1 y P1 para vertimec y pentacloro respectivamente. El método usado ha permitido conocer la citotoxicidad celular y genotoxicidad cromosómica producida por biocidas usados en la agricultura y su potencial efecto sobre la estabilidad genética.

**Referencias bibliográficas**

Ajay K., Sarbhoy R. 1987. Cytogenetical studies on the effect of some chlorinated pesticides I. Effect on somatic chromosomes of *Lens* and *Pisum*. *Cytology*. 52: 47-53.

Ajay K., Sarbhoy R. 1988. Cytogenetic studies on the effect of some chlorinated pesticides. *Cytology*. 53: 427-436.

Badr A. 1983. Mitodepressive and cytomotoxic activities of two herbicides in *Allium cepa*. *Cytology*. 48: 451-457.

Benzion G., Phillips R. 1988. Cytogenetic stability of maize tissue cultures: a cell line pedigree analysis. *Genome*. 30: 318-325.

Chand S. 1981. Effect of herbicide 2,4-dinitrophenol on mitosis, DNA, RNA and protein synthesis in *Nigella sativa*. *Biology Plant* 24: 198-202.

El-Khodary S., Habib A., Haliem A. 1990. Effects of the herbicides Tribunil on root mitosis of *Allium cepa. Cytology*. 55: 209-215.

El-Khodary S., Habib A., Haliem A. 1989. Cytological effects of the herbicide Garlon-4 on root mitosis of *Allium cepa*. *Cytology*. 54: 465- 472.

Espinoza F., Palacio S., Módenes A., Szymanski N., Silva N., Rizzutto A. 2007. Toxic effects on the *Allium cepa* L. roots by Cr6+-doped river waters. *Brazilian Synchrotron Light Laboratory*, Activity Report.

Feretti D., Zerbini I., Zani C., Ceretti C., Moretti C., Monarca S. 2007. *Allium cepa* chromosome abberation and micronucleus tests applied to study genotoxicity of extracts from pesticide-treated vegetables and grapes. *Food Additives and Contaminants*. 24 (6): 561-572.

Fiskesjo G. 1985. The *Allium* test as a standard in environmental monitoring. *Hereditas*. 102: 99–112.

Fiskesjo G. 1988. The *Allium* test an alternative in environmental studies: the relative toxicity of metal ions. *Mutation Research*. 197: 243-260.

Fiskesjo G. 1993. The *Allium* test in wastewater monitoring. *Enviromental Toxicology and Water Quality*. 8: 291–298.

Frainer M., Ferreira C., Scotti T., Bosio S. 2006. Effects of Pterocaulon polystachyum DC. (Asteraceae) on onion (*Allium cepa*) root-tip cells. *Genetics and Molecular Biology*. 29: 539-542.

Ghareeb A. 1997. Cytotoxicity of insecticide Temik 15G (Decarb) in mitotic and meiotic cells of *Vicia faba* plant. *Cytology*. 62: 259-263.

Grant W. 1978. Chromosome Aberrations in Plants as a Monitoring System. *Environmental Health Perspectives*. 27: 37-43.

Grant W. 1982. Chromosome aberration assays in Allium A report of the US Environmental Protection Agency gene tox program. *Mutation Research*. 99: 273–291.

Grant W. 1994. The present status of higher plants bioassays for the detection of environmental mutagens. *Mutation Research*. 310: 175–185.

Kabir L., Bimal K., Pankaja S., Amal K., Sang W., Chang Y., Youn Y., Shyam R. 2010. Genotoxicity evaluation of the insecticide ethion in root of *Allium cepa* L. *African Journal of Biotechnology*. 9(27): 4204-4210.

Kaur P., Grover I. 1985. Cytological effects of some organophosphorus pesticides I. Mitotic effects. *Cytology*. 50: 187- 197.

Kim J., Bendixen E. 1987. Effect of haloxyfop and CGA-82725 on cell cycle and cell division of oat (*Avena sativa*) root tips. *Weed Sci*. 35: 769-774.

Klasterska I., Natarajan A., Ramel C. 1976. An interrelation of the origin of subchromatid aberrations and chromosome stickiness as a category of chromatid aberrations. *Hereditas*. 83: 153-162.

Konuk M., Liman R., Cigerci I. 2007. Determination of Genotoxic effect of Boron on *Allium cepa* root meristemático cells. *Pakistan Journal of Botany*. 39(1): 73-79.

Lapitan N., Sears R., Gill B. 1988. Amplification of repeated sequences in wheat rye hybrids regenerated from tissue culture. *Theoretical and Applied Genetics*. 75:381-388.

Mansour K. 1984. Cytological effects of the herbicide Tribunile on *Vicia faba*. *Egyptian Journal of Botany*. 27: 191-198.

Mustafa Y., Suna E. 2008. Destroy Genotoxicity testing of quizalofop-P-ethyl herbicide using the *Allium cepa* anaphase-telophase chromosome aberration assay. *Caryologia*. 61(1): 45-52.

Nagl W. 1970. The mitotic and endomitotic nuclear cycle in *Allium carinatum* II. Relations between DNA replication and chromatinstructure. *Caryologia*. 23: 71-78.

Olufunsho A., Akintonwa A., Sunday O. 2010. Mutagenic Screening of Crude Oil Fractions Using Modified Ames Test and *Allium cepa* (Linn) Assay. *American Journal of Pharmacology and Toxicology*. 5 (1): 1-8.

Olusegun S., Fidelia I., Odeigah P. 2010. Cytogenotoxicity evaluation of two industrial effluents using *Allium cepa* assay. *African Journal of Environmental Science and Technology*. 4(1): 021-027.

Palani L., Panneerselvam N. 2007.Cytogenetic studies of food preservative in *Allium cepa* root meristem cells. *Medicine and Biology*. 14: 60-63.

Peña C., Añez B., Dávila M. 1999. Respuesta de la cebolla (*Allium cepa* L.) a la aplicación de azufre, magnesio, cinc y boro en un suelo alcalino. *Revista Forestal Venezolana*. 43(2): 173-182.

Prasad G., Das K. 1977. Effect of some growth substances on mitosis. *Cytology*. 42: 323-329.

Ragunathan I., Panneerselvam N. 2007. Antimutagenic potential of curcumin on chromosomal aberrations in *Allium cepa. Journal of Zhejiang Univ Sci*. 8(7): 470-475.

Rank J. 2003. The method of Allium anaphase – telophase chromosome aberration assay. Department of environment, technology social studies. *Ekologija*. Activity Report.

Sato S., Kawamura S. 1981. Cytological studies on the nucleolus and the NOR-carrying segments of *Allium sativum*. *Cytology*. 46:781–790.

Shukla Y., Arora A., Taneja P. 2002. Anti-mutagenic potential of curcumin on chromosomal aberrations in Wistar rats. *Mutation Research*. 515:197-202.

Srivastava R., Kumar D. 2005. Bioremediation of municipal sludge by vermitechnology and toxicity assessment by Allium cepa. *Bioresource Technology*. 96(17): 1867-1871.

Tartar G., Kaymak F., Gokalp F. 2006. Genotoxic Effects of Avenoxan on *Allium cepa L*. and *Allium sativum L*. *Caryologia*. 59(3): 241-247.

Tomkins D., Grant W. 1972. Comparative cytological effects of the pesticides Menazon, Metobromuron and Tetrachloriosphthalonitrile in *Hordeum* and *Tradescantia. Canadian Journal of Genetics and Cytology*. 14: 245-256.

Ukaegbu M., Odeigah P. 2009. The Genotoxic Effect of Sewage Effluent on *Allium Cepa. Report and Opinion*. 1(6): 36-41.

Wuu K., Grant W. 1967. Morphological and somatic chromosomal aberrations induced by pesticides in meiotic cells of Barley (*Hordeum* *vulgare*). *Canadian Journal of Genetics and Cytology*. 8: 481-501.

Yuzbasioglu D., Unal F., Sancak C., Kasap R. 2003. Cytological effects of the herbicide racer flurochloridone on *Allium cepa*. *Caryologia*. 56: 97-105.

Vertimec - Syngenta. 2012. Acaricida e insecticida para el control de ácaros en cultivos <www.syngenta.com/country/cl/cl/soluciones/proteccioncultivos/Paginas/Vertimec.aspx> (acceso 4/06/2012).

Serfi S.A(R). 2012. Pentacloro Saume es un fungicida que previene enfermedades en las semillas-cultivos <www.serfi.com.pe/INTERIOR/productos\_peru/pentacloro\_saume.html>   
(acceso 10/06/2012).

**Tabla 1**- Se presenta el valor promedio del desarrollo radicular y coeficiente de inhibición de desarrollo radicular para cada tratamiento, obtenido en la última medición. Se muestra el índice mitótico y porcentaje de inhibición mitótica para cada tratamiento.

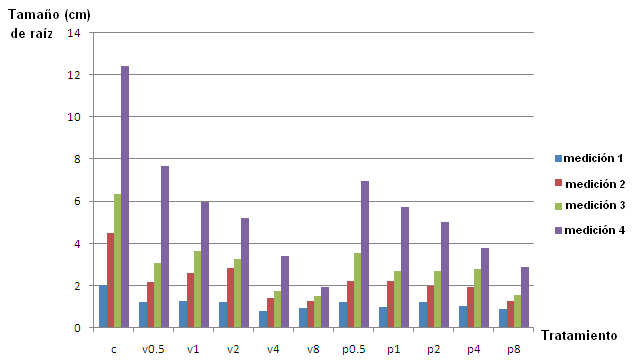
|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| Tratamiento | Longitud de raíz (cm) | CI | IM (índice mitótico)% | % de inhibición de la mitosis |
| C | 12.416 | 0 | 0.1639 | 0 |
| v0.5 | 7.668 | 0.382 | 0.1109 | 32.34 |
| p0.5 | 6.976 | 0.438 | 0.0737 | 55.03 |
| v1 | 5.976 | 0.519 | 0.0691 | 57.84 |
| p1 | 5.732 | 0.538 | 0.0393 | 76.02 |
| v2 | 5.218 | 0.58 | 0.0214 | 86.94 |
| p2 | 5.026 | 0.595 | 0.1073 | 34.53 |
| p4 | 3.776 | 0.696 | 0.0725 | 55.77 |
| v4 | 3.436 | 0.723 | 0.0662 | 59.61 |
| p8 | 2.916 | 0.765 | 0.0419 | 74.44 |
| v8 | 1.962 | 0.842 | 0.0284 | 82.67 |

**Tabla 2**- Valor porcentual de células en las distintas fases mitóticas y el porcentaje de células en mitosis para un total de 30694 células contabilizadas, en los tratamientos.

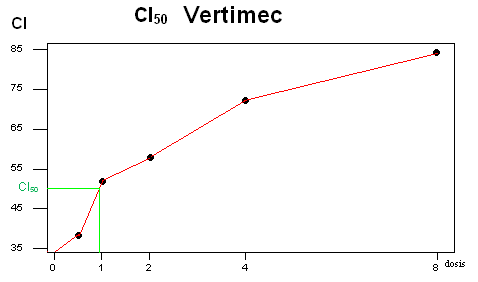
|  |  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| Tratamiento | Profase(%) | Metafase(%) | Anafase(%) | Telofase(%) | Mitosis(%) | Interfase(%) | Total células |
| Control | 45.43 | 25.87 | 13.26 | 15.43 | 16.39 | 83.61 | 2806 |
| V0.5 | 54.93 | 22.70 | 11.84 | 10.53 | 11.09 | 88.91 | 2740 |
| V1 | 55.83 | 22.82 | 11.17 | 10.19 | 7.37 | 92.63 | 2794 |
| V2 | 70.31 | 19.79 | 6.25 | 4.69 | 6.91 | 93.09 | 2778 |
| V4 | 72.73 | 15.45 | 7.27 | 4.55 | 3.93 | 96.07 | 2802 |
| V8 | 81.67 | 8.33 | 5.00 | 5.00 | 2.14 | 97.86 | 2810 |
| P0.5 | 57.33 | 21.33 | 10.33 | 11.00 | 10.73 | 89.27 | 2796 |
| P1 | 61.50 | 20.50 | 10.50 | 7.50 | 7.25 | 83.25 | 2758 |
| P2 | 70.65 | 16.85 | 9.24 | 3.26 | 6.62 | 93.38 | 2778 |
| P4 | 72.03 | 16.10 | 8.47 | 3.39 | 4.19 | 95.81 | 2818 |
| P8 | 77.50 | 11.25 | 7.50 | 3.75 | 2.84 | 97.16 | 2814 |
| Número de células contabilizadas | | | | | | | 30694 |

**Tabla 3**- Anomalías encontradas en las células mitóticas de los distintos tratamientos con biocidas (1754 células mitóticas observadas). Frecuencia de las anomalías dentro de los tratamientos con biocidas. No se considera al tratamiento control ya que no indica el efecto de mutagénico de los biocidas, además no se observaron anomalías en los controles.

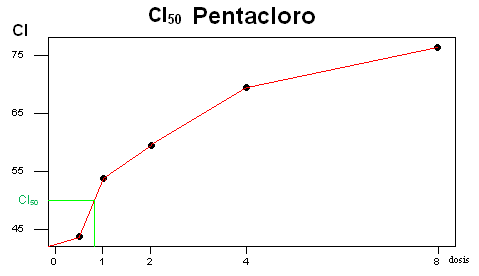
|  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| Tratamiento | Puente anafásico | Células binucleadas | C-mitosis | Células con micronúcleos | Otros |
| C | - | - | - | - | - |
| p0.5 | - | 2 | - | - | - |
| P1 | - | - | 2 | - | - |
| P2 | 2 | - | 2 | - | 1 |
| P4 | - | - | 1 | 1 | 4 |
| P8 | - | - | 1 | - | 7 |
| v0.5 | - | 1 | 1 | - | - |
| V1 | 2 | - | 2 | - | - |
| V2 | - | - | 3 | 1 | 2 |
| V4 | - | - | 2 | - | 5 |
| V8 | - | - | 1 | - | 8 |
| total | 4 | 3 | 15 | 2 | 27 |
| Total de anomalías observadas= 51; frecuencia de anomalías=51/1754= 0.03 | | | | | |



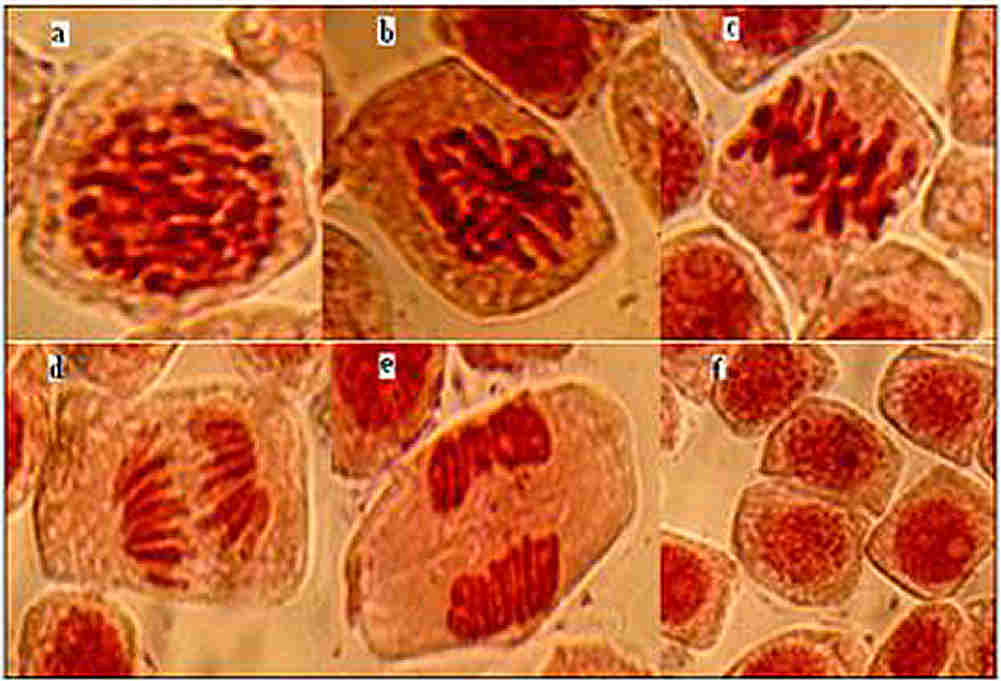
**Figura 1**- Desarrollo radicular por día de medición para los tratamientos con biocidas y el control. La primera medición no mostro diferencias estadísticas entre los tratamientos, en la segunda y tercera medición aparecieron diferencias estadísticas sin embargo el CV fue mayor a 10, finalmente en la cuarta medición se observaron diferencias significativas entre los tratamientos y el CV fue de 9.88.



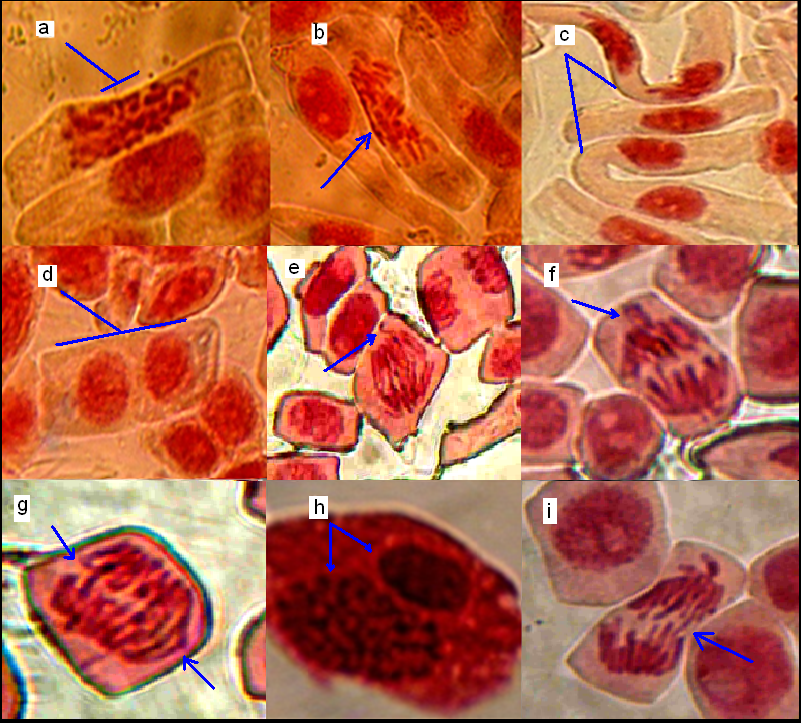
**Figura 2**- Estimación del CI50 para vertimec, cada punto representa una dosis (V0.5, V1, V2, V4, V8) en la horizontal y el porcentaje del coeficiente de inhibición del desarrollo radicular en la vertical.



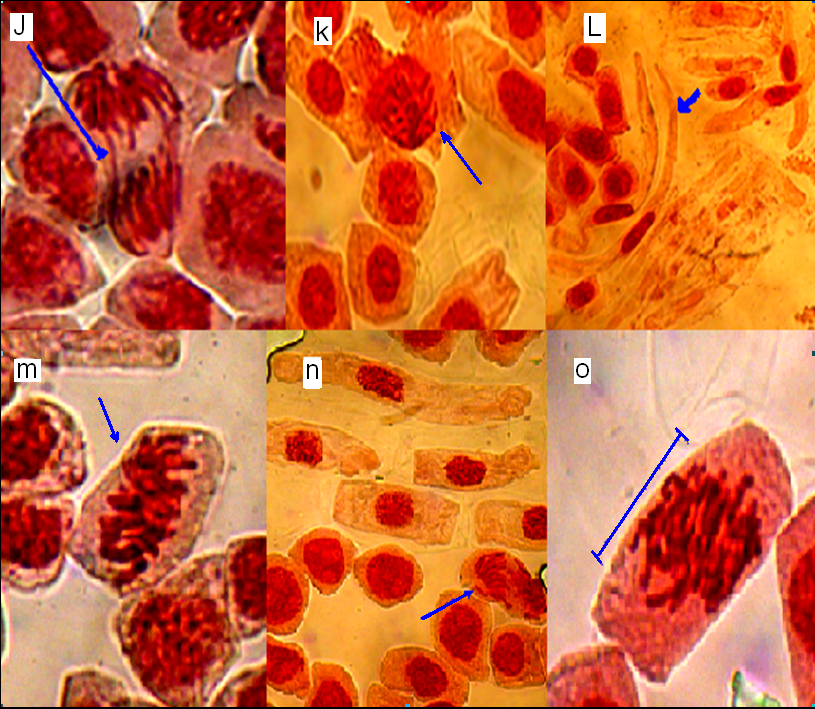
**Figura 3**- Estimación del CI50 para pentacloro, cada punto representa una dosis (P0.5, P1, P2, P4, P8) en la horizontal y el porcentaje del coeficiente de inhibición del desarrollo radicular en la vertical.

****

**Figura 4**– Diferentes etapas del ciclo de división celular normal (en el tratamiento control); a: profase, b: prometafase, c: metafase, d: anafase, e: telofase y formación de fragmoplasto, f: citocinesis. (60X).

****

**Figura 5**- Diferentes anomalías observadas en los tratamientos, a y b: c-mitosis, c y d: célula binucleada, e: fragmento cromosómico, f: puente anafásico, g: fusiones cromosómicas, h: célula binucleada, i: puente anafásico. (60X).

****

**Figura 6**- Diferentes anomalías observadas en los tratamientos, j: puente anafásico, k: c-mitosis, l: células alargadas, m: c-mitosis, n: células alargadas y fragmento cromosómico, o: anomalía de fase. (60X).