

188
2ej



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

**EFFECTO DEL HERBICIDA MOLINATE (ORDRAM)
SOBRE LAS CELULAS MERISTEMATICAS DE LA
RAIZ DE Vicia faba**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE

B I O L O G O

P R E S E N T A :

MARIA DE LOURDES RODRIGUEZ MADRID

REALIZADA BAJO LA DIRECCION DE LA
DRA. SANDRA GOMEZ ARROYO

EN EL LABORATORIO DE CITOGENETICA Y MUTAGENESIS AMBIENTALES
DEL CENTRO DE CIENCIAS DE LA ATMOSFERA

MEXICO, D. F.

1992

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

CONTENIDO

	PAG.
RESUMEN	1
INTRODUCCION	2
MATERIAL Y METODOS	12
RESULTADOS	15
DISCUSION Y CONCLUSIONES	17
REFERENCIAS	25
TABLAS Y FIGURAS	33

EFFECTO DEL HERBICIDA MOLINATE (ORDRAM)
SOBRE LAS CELULAS MERISTEMATICAS DE LA RAIZ DE
Vicia faba

RESUMEN

Se evaluó el efecto del herbicida molinate sobre las células meristemáticas de la raíz de *Vicia faba* en las etapas de metafase y anafase. Se probaron concentraciones de 25, 50, 100, 200, 300, 400, 500 y 1000 ppm. Los resultados muestran que el molinate a 100 ppm incrementa la frecuencia de alteraciones cromosómicas, tales como cromosomas con el centrómero inactivado, anafases multipolares, isocromosomas, puentes sencillos y dobles así como fragmentos cromatídicos e isocromatídicos. También se registró la presencia de micronúcleos en células en interfase. A partir de 200 ppm se observó muerte celular.

INTRODUCCION

El empleo continuo de amplia variedad de productos químicos así como los desechos industriales y agrícolas, representan serios problemas de contaminación lo que constituye riesgo potencial para la salud del hombre y de cualquier ser vivo.

En agricultura, es necesario el uso de pesticidas para controlar y erradicar organismos nocivos que ocasionan grandes pérdidas a la productividad, sin embargo, la utilización excesiva de éstos ha tenido consecuencias deletéreas en el medio ya que millones de toneladas son arrojadas directamente sobre los cultivos.

Estas sustancias tóxicas son posteriormente arrastradas por las precipitaciones pluviales al mar afectando la vida acuática y terrestre a través de la cadena trófica.

Se han encontrado rastros de pesticidas en peces, aves y algunos vegetales (García-Lara, 1975). Gran cantidad de

éstos han sido registrados en la Agencia de Protección Ambiental como perjudiciales (Guthrie, 1980). Varios autores los han descrito como mutagénicos, teratogénicos y carcinogénicos (Kay, 1974; Seiler, 1978; Marliac, 1979).

Entre los pesticidas se ubican a los herbicidas, los cuales se han aplicado desde épocas antiguas, principalmente las sales de cobre, ácido sulfúrico, clorato de sodio, boratos y sales de arsénico, en dosis masivas (Hartley y West, 1976).

Más tarde con el desarrollo de la industria química se empieza a introducir otro tipo de agentes como son los herbicidas inorgánicos, derivados del petróleo, compuestos nitrados y productos hormonales. Desde 1945 y en los últimos 25 años el incremento ha sido tal que da origen a gran variedad de herbicidas orgánicos. El consumo de herbicidas supera al de otros pesticidas (Barberá, 1976).

Entre los diferentes herbicidas, los carbámicos constituyen un grupo importante, todos ellos se derivan del ácido carbámico HO-CO-NH_2 del que existen dos tipos, los tiolcarbámicos HS-CO-NH_2 y los ditiocarbámicos SH-SC-NH_2 ; se conocen las sales de ésteres de éstos ácidos obtenidos por sustitución del hidrógeno en los OH- y SH- por radicales orgánicos, además los hidrógenos del amino se reemplazan total o parcialmente por radicales orgánicos (Barberá, 1976).

Los herbicidas son productos volátiles a presiones de vapor muy elevadas, la mayoría son fácilmente incorporados al suelo donde persisten por corto tiempo, su ingreso al vegetal es a través de la raíz y por los coleóptilos en crecimiento, los microorganismos del suelo contribuyen a su degradación (Kaufman, 1967).

Se han descrito estudios de acerca del efecto citológico (Amer, 1974) y genético (Turkula y Jalal, 1985) de algunos herbicidas ya que actúan principalmente inhibiendo la división celular, lo que interfiere directamente con el crecimiento de la planta (Corbett, 1974). Son metabolizados rápidamente en el hígado de rata, la sulfoxidación parece ser el mecanismo general cuando se realiza la desintoxicación de estos herbicidas (Casida et al., 1973).

Con respecto a su efecto genético, se han probado los herbicidas tiolcarbámicos para observar su actividad mutagénica en *Salmonella typhimurium* con requerimiento de histidina, con y sin activación metabólica notándose que en las cepas TA 100 y TA 1535 son mutagénicos solo en presencia de activación metabólica causando sustitución de pares de bases (Sikka y Florezky, 1978).

Innes et al. (1969) observan que las ratas expuestas a diafato en una concentración de 100 mg/kg desarrollan tumores lo que indica que es un carcinógeno y su exposición es peligrosa.

El molinate (S-etil hexahidroazepina 1-carbotionato) es un herbicida tiolcarbámico con una solubilidad en agua de 1000 ppm a 20 °C, así como en acetona, isopropanol, metanol y xileno. (Fig.1)

Cepas de de microorganismos aislados del suelo fueron incubados en medio de cultivo adicionado con 40 y 50 ppm de molinate encontrándose que *Mycobacterium* sp., *Streptomyces* sp. y *Fusarium* sp., crecen y lo degradan a pH de 5 a 7 y temperatura de 20 a 30 °C a través de un proceso co-metabólico (Horvat, 1972).

Es descompuesto por enzimas extracelulares o por enzimas celulares después de que penetra a través de la membrana de *Mycobacterium* sp., para que este proceso se realice en la rizosfera de *Fusarium* sp. se requieren altas concentraciones de aminoácidos y azúcares (Wright, 1978). El exceso de nutrientes en *Mycobacterium* sp. y *Flavobacterium* sp. suprime su actividad mientras que en *Streptomyces* sp. la promueve (Imai y Kuwatsuka, 1986).

En *Mycobacterium* sp. y *Flavobacterium* sp. el molinate se oxida en la radical S-etil y después en el anillo azepina, posteriormente dicha oxidación se efectúa en el átomo de azufre, en *Fusarium* sp. sólo ocurre en el anillo azepina (Imai y Kuwatsuka, 1986).

La vida media de este compuesto en suelos

superficiales es de 8 a 25 días y en los profundos es de 40 a 160 . En los suelos estériles su descomposición es lenta mientras que en los fértiles es rápida, lo que implica que los microorganismos contribuyen a este proceso.

Se han estudiado las posibles vías metabólicas del molinate en suelos, la primera indica que el átomo de azufre es oxidado para originar sulfóxido y sulfona los cuales son hidrolizados a HMI (Hidroximetilenoimina), la segunda plantea la oxidación en la posición 2 y 4 de los carbonos del anillo azepina encontrándose como productos 4 Hidroxi- y 4oxo-molinate, en la tercera se propone que ocurre oxidación de la molécula etil para formar molinate alcohol y molinate ácido (Imai y Kuwatsuka, 1982). Se sugiere que la segunda vía puede ser la más importante en condiciones profundas y la tercera a niveles superficiales.

Kaufman (1967) propone que los herbicidas tiolcarbámicos se degradan por hidrólisis de los enlaces N-CO-S en suelos, sin embargo, se observa que la reacción principal del molinate es la oxidación de los alquil carbonos en condiciones húmedas, algunos residuos de éstos permanecen en el suelo. Este herbicida es tóxico en gramíneas, y se usa para el control de *Echinochloa* sp. en arroz (Worting, 1984).

En plántulas del pasto (*Echinochloa crus. galli* var. Orizacol Ohwi) se utiliza molinate marcado con C¹⁴ a 10 ppm por 48 horas de exposición en donde se absorbe a través de

la raíz y de la parte basal del tallo, la radioactividad se distribuye en dos sentidos acropétalo y basipétalo; éstas plántulas lo degradan y sus tejidos tienen gran capacidad para transportarlo, los metabolitos que se obtienen son molinate sulfóxido, 4OH molinate, molinate alcohol, 2-oxo molinate, S-etil N-carboximetil tiocarbamato (CMET), molinate ácido hexametilenoinina (HMI), 2 oxo HMI y 4 OH HMI. Los metabolitos que se encuentran en mayor cantidad son molinate alcohol 4-oxo y 2-oxo molinate (Imai y Kuwatsuka, 1983).

En plántulas de arroz (*Oryza sativa*) se observa que con 10 ppm de molinate marcado con C^{14} tratadas por 48 horas se absorbe el 7 % de la radioactividad por la raíz, si durante cinco días posteriores a la exposición las plántulas se trasladan a un medio libre de molinate C^{14} se nota que una parte de la radioactividad se desprende como CO_2^{14} y el 60 % es liberado de las raíces al medio de cultivo, sin embargo el 30% permanece en las plántulas (Imai y Kuwatsuka, 1983).

En plántulas se conoce la posible vía metabólica proponiéndose que el átomo de azufre es oxidado a sulfóxido y convertido a compuestos conjugados, una parte del sulfóxido puede ser transformado a (HMI) probablemente a través del sulfóxido de la molécula de molinate, los átomos de carbono del anillo azequina son oxidados a derivados hidroxilo y oxo, éstos radicales son metabolizados a OH-HMI y oxo HMI. Después se oxida el átomo de azufre y se hidroliza a CMET por la fusión del anillo azequina, el carbón final de

la molécula S-etil se oxida a hidroximolinate alcohol y a carboximolinate ácido (Imai y Kuwatsuka, 1983). (Fig. 2)

Se ha descrito que los átomos de carbono del radical N-alquil de algunos herbicidas tiolcarbámicos son incorporados a las plantas (Gray, 1969). El modo de acción de estos herbicidas en vegetales es mediante la formación de radicales sulfhidrilo (Casida et al., 1975).

No hay estudios acerca de la toxicidad crónica, sin embargo se han realizado ensayos para determinar los límites de tolerancia media (LTM) en crustáceos, resultando ser tóxico en *Rangia cuneata* con 24 horas de exposición a 3 libras/galón (Chayarach y Ratananum, 1975).

En mamíferos es metabolizado rápidamente, se ha observado que en ratas aproximadamente el 80% es excretado por la orina y el 10% por las heces, cuando se usa una dosis de 72 mg/kg por 48 horas (De Baun y Bova, 1978a).

Por otro lado, se analizan varios tejidos de ratas previamente tratadas con molinate marcado con C^{14} a una dosis de 72 mg/kg por vía oral encontrándose que los residuos asociados a éstos decrecen al séptimo día después de aplicarlo, con la excepción de que en sangre se obtiene un nivel alto, el cual permanece constante por este mismo período (De Baun y Bova, 1978b).

Hubell y Casida (1977) han mencionado que en ratas inyectadas intraperitonealmente con 1.0 m mol/Kg de molinate se excreta el 2% de la dosis como N-acetil S-hexahidroazepina-1-carbonil cisteina en la orina.

También ha sido probado sobre el sistema inmune de rata, donde no se nota efecto con 160-320 mg/Kg/día, sin embargo, debido aparentemente a un efecto de toxicidad general del herbicida el 40% de los animales mueren (Smialowiz y Luebke, 1985).

Kawatsu (1977) reporta que el molinate a 0.32 ppm durante 21 días de exposición en carpa japonesa (var. Yamato Koi) produce hemorragia branquial. Ochiai y Kubota (1978) describen en carpa americana con 10 ppm que adicionando vitamina K por 14 días de tratamiento se reducen los efectos tóxicos, posteriormente se realiza otro estudio en carpa japonesa con molinalte a 1.2 ppm agregando ácido L-ascórbico donde se nota que también disminuye su toxicidad.

Lay y Menn (1987) mencionan que el molinate es rápidamente metabolizado a molinate sulfóxido y molinate sulfona. El primero a 4 ppm durante dos semanas de exposición mata a las carpas japonesas en un periodo de 5 a 7 días. Mientras que mueren al aplicarles el segundo a la misma concentración durante 30 minutos resultando mucho más tóxico que el molinate sulfóxido.

La LD₅₀ en ratas administrada por vía oral es de 501-720 mg/Kg de peso, en tanto que por aplicación dérmica es superior a 2000 mg/kg (Barberá, 1976).

Con el propósito de detectar los efectos genéticos y tóxicos inducidos por la gran variedad de mutágenos químicos y físicos presentes en el medio y de evaluar el riesgo que representan para la salud del hombre, se han desarrollado diversos sistemas biológicos de prueba. Uno de ellos lo constituyen las células meristemáticas de la raíz principal de *Vicia faba*, que ofrece amplias posibilidades para estudios citogenéticos ya que su número cromosómico no es elevado ($2n = 12$), el gran tamaño de sus cromosomas permite su fácil observación (Kihlman, 1975), además de que existe elevado porcentaje de células en división. Su cariotipo normal está formado por un par de cromosomas metacéntricos que poseen una gran constricción secundaria en la región del organizador nucleolar, que separa un largo satélite y cinco pares de cromosomas subacrocentricos. La duración del ciclo celular en la raíz principal es de 19.3 horas a 19 °C. La interfase incluye los periodos G₁ (presintético), S (sintético) y G₂ (postsintético), que tienen una duración de 4.9, 7.5 y 4.9 horas respectivamente y la mitosis es de 2 horas (Evans y Scott, 1964).

La división celular es afectada por sustancias que influyen en algunas de sus fases, en la formación del huso mitótico y en la citocinesis (Kihlman, 1966). Los agentes que impiden la entrada de las células en mitosis inhiben

las divisiones de éstas así como del núcleo y de los cromosomas.

Los agentes físicos y químicos por el tipo de aberraciones que inducen y dependiendo de que para la expresión de dichas alteraciones, se requiera pasar por la etapa de síntesis se han clasificado en S-dependientes y S-independientes y de acuerdo al momento en que aparecen se consideran de efecto retardado y efecto no retardado (Kihlman et al., 1978).

Debido a la importancia que tienen los herbicidas y la escasa cantidad de investigaciones que se han realizado acerca de su posible daño citogenético, en este trabajo se pretende evaluar el efecto del herbicida tiolcarbámico molinate sobre los cromosomas de las células meristemáticas de la raíz de *Vicia faba*, mediante el registro de aberraciones en metafase y en anafase.

MATERIALES Y METODOS

Para la realización de los experimentos que a continuación se describen, se utilizaron semillas de *Vicia faba* var. *minor*, las cuales se lavaron en agua corriente por 2 horas. Posteriormente se sumergieron en agua durante 24 horas a temperatura constante a 21 °C con el objeto de acelerar la germinación.

Transcurrido este tiempo se lavaron en agua corriente y se colocaron entre dos capas de algodón húmedo manteniéndolas en la oscuridad y a temperatura constante hasta que apareció la radícula, en ese momento se removió la testa para evitar la contaminación por hongos. Cuando las raíces midieron de 4 a 6 cm de longitud se eliminó la cofia y se procedió a la experimentación.

Se prepararon soluciones de molinate (Ordram) con las siguientes concentraciones: 25, 50, 100, 200, 300, 400, 500 y 1000 ppm en un volumen de 500 ml cada una, se colocaron en vasos de precipitado cubiertos con papel aluminio perforado previamente para introducir las raíces de las plántulas y lograr su contacto con la solución.

Para el análisis de las células en anafase, el tiempo de tratamiento fue de 4 horas con 2, 8 y 14 de recuperación y de 0, 5 y 11 horas de recuperación más tres horas de colchicina para acumular metafases, al iniciar la recuperación las plántulas se lavaron para eliminar el exceso de pesticida.

La recuperación se llevó a cabo en un baño con agua corriente, aireación y temperatura constantes (21°C) en la oscuridad durante los lapsos ya mencionados. Los lotes testigo, uno para cada caso, se mantuvieron en las mismas condiciones que los expuestos, excepto que las raíces se sumergieron en agua destilada, después se hicieron cortes de 2 mm de longitud de las puntas de las raíces se fijaron en etanol-acético (3:1) y se agregó HCl 5N por 20 minutos en baño María a 28 °C a continuación se lavaron por 3 minutos tres veces con agua destilada, se secaron y se tñeron con el reactivo de Schiff (tinción de Feulgen) durante 22 minutos en la oscuridad, posteriormente se trataron con pectinasa al 2% disuelta en amortiguador de citratos a pH 4.7 por 10 minutos para los testigos y aproximadamente 40 minutos para los tratados esta diferencia de tiempo fue debida al endurecimiento que mostraron.

En seguida, se desechó el exceso de pectinasa y los cortes se pusieron en portaobjetos planos que contenían una gota de ácido acético al 45 %, se colocó un cubreobjetos y se hizo presión con la goma de un lápiz para obtener el aplastamiento en monocapa ("squash").

Para hacer las preparaciones permanentes se utilizó la técnica de Conger y Fairchild (1953), acomodándolas sobre hielo seco hasta que estuvieron completamente congeladas. Después se desprendió el cubreobjetos con un bisturí y se deshidrataron con dos cambios rápidos de butanol absoluto, se secó el alcohol y se montaron en bálsamo de Canadá (Sigma).

Las laminillas fueron manejadas por medio de una clave para evitar prejuicios en el observador.

Con el objeto de cuantificar las aberraciones se analizaron todas las células en anafase y 100 metafases presentes en cada una de las diferentes preparaciones, además se obtuvo la frecuencia de micronúcleos en células en interfase.

En todas las concentraciones y tiempos de recuperación, así como en sus respectivos testigos se realizaron los experimentos y la repetición de los mismos.

RESULTADOS

El efecto producido por el molinate en los cromosomas de las células meristemáticas de la raíz principal de *Vicia faba* se evalúa mediante el análisis de las alteraciones que se presentan en células en metafase y anafase después de diferentes tratamientos con sus respectivos tiempos de recuperación (Tabla I a la VI).

Se analizaron 200 células en metafase encontrándose aberraciones como rompimientos isocromatídicos, cromatídicos y anillos cromatídicos, las alteraciones se presentan a partir de las 4 horas de tratamiento con 5 de recuperación mas 3 horas de colchicina para acumular metafases (12 horas desde el inicio del tratamiento), se manifiestan en 25, 50 y 100 ppm mientras que en las concentraciones de 200, 300, 400, 500 y 1000 ppm se observa muerte celular tanto en 12 como en 18 horas postratamiento (Tablas I a III).

Con 4 horas de molinate y 3 de colchicina no hay efecto en ninguna de las concentraciones probadas y la muerte celular se produce a partir de 400 ppm (Tabla I).

En tanto que en los lapsos de recuperación mayores de

(8 y 14 horas) aparecen aberraciones de tipo cromatídico e isocromatídico notándose que al aumentar la concentración se incrementa la frecuencia de aberraciones y a partir de 200 ppm se induce la muerte celular (Tablas II y III).

Cuando las alteraciones se analizan en anafase, se observa un comportamiento similar ya que en 4 horas de exposición y dos de recuperación no se presentan aberraciones cromosómicas, sólo se evidencian isocromosomas y anafases multipolares en 100 ppm y a partir de 400 ppm se provoca la muerte celular.

En el caso de los micronúcleos, estos se encuentran en casi todas las concentraciones pero con un comportamiento muy errático (Tabla IV).

En los tratamientos de 4 horas y 8 de recuperación se evidencian aberraciones y cromosomas con el centrómero inactivado, solo en este caso y en el de las anafases anormales se presenta respuesta de acuerdo con la concentración, en las otras alteraciones no hay dicho comportamiento (Tabla V). Cuando se expusieron las raíces a 4 horas y se recuperaron por 14 se nota que al aumentar la cantidad de molinate se eleva la frecuencia de anafases anormales, aberraciones totales e isocromosomas, en tanto que en los demás casos no ocurre (Tabla VI).

DISCUSION Y CONCLUSIONES

Las plantas superiores se han usado ampliamente en el estudio de los efectos genéticos de gran variedad de mutágenos físicos y químicos (Nilan et al., 1963). Los estudios realizados con las raíces principales de *Vicia faba* para detectar aberraciones cromosómicas provocadas con productos químicos ambientales lo describen como un sistema adecuado (Grant et al., 1981; Ma, 1982; Gómez-Arroyo y Villalobos-Pietrini, 1983).

Para investigar los efectos de estos agentes a nivel citogenético generalmente se observan los cromosomas en la etapa de división celular correspondiente a la metafase y/o anafase, que es cuando se encuentran más contraídos e identificables (Conger, 1965; Kihlman, 1975; Savage, 1975).

En este trabajo se decidió evaluar el daño provocado por el molinate en ambos estados, puesto que se pueden observar alteraciones como rompimientos isocromatídicos, cromosómicos y anillos, así como efectos a nivel del centrómero y del huso mitótico.

Las alteraciones que se presentan en células en anafase son cromosomas con el centrómero inactivado, isocromosomas y anafases multipolares.

Según Kihlman (1966) los agentes físicos y químicos se han clasificado de acuerdo con el momento en que aparecen las aberraciones, cuando estas se presentan 3 horas después de iniciado el tratamiento y su frecuencia máxima está entre las 4 y las 10 horas, se consideran como de efecto no retardado, sin embargo cuando surgen 8 horas después del tratamiento y su frecuencia máxima se manifiesta entre las 24 y las 48 horas hay efecto retardado, denominándose S-independientes y S-dependientes, respectivamente (Kihlman et al., 1978).

En este trabajo la aplicación de distintos tiempos de recuperación se hizo con el fin de establecer la sensibilidad de las diferentes etapas del ciclo celular y determinar el comportamiento que tiene el molinate con respecto a la aparición de las aberraciones en cuanto a efecto retardado o no retardado y por lo tanto si se comporta como un agente S-dependiente o S-independiente.

Ejemplos de agentes S-dependientes son las radiaciones ultravioleta y los agentes alquilantes (Bender et al., 1973) y de S-independientes son las radiaciones ionizantes, antibióticos como la bleomicina, pleomicina así como algunas oxipurinas metiladas (Kihlman, 1977).

En el caso de los S-dependientes se requiere de la síntesis de ADN para que las aberraciones se expresen y únicamente originan alteraciones cromatídicas no importando el estado del ciclo celular en el que se encuentren las células sobre las que actúan y son producidas por rompimientos de banda sencilla y daño a las bases del ADN (Kihlman *et al.*, 1978).

Con los S-independientes, las aberraciones se presentan sin que sea necesaria la síntesis de ADN y se provocan alteraciones de diferentes tipos de acuerdo a la etapa del ciclo celular en donde se lleve a cabo el efecto, siendo estas subcromatídicas cuando la unidad de ruptura es media cromátida y las alteraciones se inducen en profase; cromatídicas si la unidad de rompimiento es la cromátida y se forman en S y en G_2 y cromosómicas donde la unidad de ruptura es el cromosoma y se produce en G_1 , estas alteraciones son el resultado de daño a las bases y de rompimiento de banda sencilla y doble (Kihlman *et al.*, 1978).

De acuerdo con los resultados obtenidos se observa que el molinate aplicado a diferentes concentraciones y tiempos de recuperación altera los cromosomas de la células de la raíz de *Vicia faba* cuantificándose el efecto en las etapas de anafase y metafase. En esta investigación las aberraciones se presentan a partir de las 12 horas después de iniciado el tratamiento en ambas fases, esto indica que el agente utilizado se comporta como S-dependiente y con efecto retardado y las alteraciones que se inducen son de

tipo cromatídico, lo que muestra que se requiere de la síntesis de ADN para que las lesiones se manifiesten como resultado de errores durante la replicación (Evans, 1966).

Al respecto se sabe que los agentes alquilantes son un grupo importante en la inducción de mutaciones y tal vez son los mejor estudiados (Verly, 1974), éstos actúan como especies electrofílicas capaces de reaccionar con el ADN en los átomos de nitrógeno y de oxígeno de las bases adenina, guanina y citocina también con los grupos fosfato, teniendo preferencia por el N₇ de la guanina aunque el O₄ de esta base es el sitio alquilado más importante para la mutagenéesis.

La alta reactividad de estas sustancias se debe a la formación de iones carbonilo positivos, los cuales son altamente nucleofílicos (Verly y Brakier, 1970). Se describen dos tipos de agentes alquilantes, de acuerdo con su funcionalidad es decir, al número de contactos que puedan establecer con el sitio de reacción que depende de la cantidad de grupos alquilantes que presentan (Brendel y Ruhland, 1984).

Los agentes monofuncionales tienen un grupo alquil activo y producen en el ADN bases alquiladas, sitios apurínicos y rupturas monocatenarias siendo este daño reparado en la mayoría de los casos, las bases alquiladas que no son reparadas se consideran sitios de mutación, debido a esto, los agentes alquilantes son altamente

mutagénicos (Strauss et al., 1969).

Los agentes bifuncionales actúan frecuentemente como monofuncionales, pero a veces alquilan dos sitios simultáneamente, por lo general dos guaninas entre las cuales se establecen puentes intracatenarios o intercatenarios, éstos causan retraso en el ciclo celular y en muchos casos impiden la replicación del ADN ocasionando la muerte celular (Strauss et al., 1969; Verly y Brakier, 1970; Lawley, 1974; Chen et al., 1981). Estos compuestos no solo inducen mutaciones puntuales y aberraciones cromosómicas, sino que también son altamente tóxicos, teratogénicos y carcinogénicos (Koller, 1969).

El efecto mutagénico de los agentes alquilantes según Bautz y Freeze (1960) se explica debido a los cambios producidos en una base del ADN alquilada que provocan la separación de ésta dejando un filamento incompleto en su información el cual puede dirigir la incorporación de cualquiera de las bases existiendo posibilidades de un par de bases erróneas en su replicación.

Este herbicida presentó un efecto fitotóxico a partir de 200 ppm observándose necrosis y flacidez en la radícula conforme aumentó la concentración, provocando el deterioro del tejido hasta producir la muerte celular. Este daño posiblemente se deba a que el molinate se comporte como un agente alquilante debido al radical etilo que presenta su molécula, se ha visto que los agentes alquilantes pueden

reaccionar con el ARN, las proteínas y los lípidos (Veleminsky et al., 1973), y son capaces de interactuar con las bases púricas y pirimidicas de los ácidos nucleicos (Heslot, 1977).

Se ha propuesto que los metabolitos producidos por ciertos herbicidas tiolcarbámicos en ratas expuestas contienen una molécula alquilmercaptano la cual se forma por hidrólisis de la molécula tiolcarbámica en la unión éster (Fang, 1975; Ong y Fang 1976) y es posible que la molécula cloroalquilmercaptano provocada por estos herbicidas pueda reaccionar con las bases pirimidicas en el ADN, tal vez induciendo efectos mutagénicos (Szabo et al., 1970).

En este trabajo se observa que el molinate causa alteraciones como son cromosomas con el centrómero inactivado, isocromosomas, anafases multipolares, fragmentos cromatídicos e isocromatídicos, anillos cromatídicos y micronúcleos.

Los cromosomas con el centrómero inactivado quedan fuera de la cinética normal de la anafase (Gómez-Arroyo et al., 1985), ya que no se integran a los núcleos hijos y posteriormente darán origen a células aneuploides, debido a la pérdida o adición de cromosomas. Los isocromosomas se inducen por la ruptura transversal del centrómero (Ramanna y Natarajan 1966; Nicolff y Gecheff, 1976).

Las anafases multipolares se manifiestan como alteraciones en el huso mitótico en este caso se forman más de dos grupos de cromosomas lo que da como resultado reducción en el número cromosómico (Levan, 1938). El huso esta constituido por microtubulos los cuales son el resultado de la polimerización lineal de las moléculas de tubulina que se unen una con otra dando lugar a una fibra, los enlaces entre las moléculas de proteínas son de tipo disulfuro y las moléculas se agrupan paralelamente entre si por puentes de hidrógeno (Brachet, 1975). En el caso del molinate también tiene efecto a este nivel.

Los micronúcleos se observan en células en interfase y son la expresión de los fragmentos acéntricos, éstos resultan del rompimiento de las cromátidas y de cromosomas con el centrómero inactivado e isocromosomas los cuales no son transportadas por el huso a los polos durante la anafase (Schmid, 1975., Gomez- Arroyo et al., 1985) quedando excluidos de los núcleos hijos, su tamaño varia de acuerdo con el tamaño y la cantidad de rompimientos que son inducidos por la sustancia (Ma, 1979).

En este trabajo los micronúcleos no muestran un comportamiento claro, sin embargo esta prueba puede ser empleada como un criterio rápido para determinar si un agente físico o químico induce daño cromosómico. Tanto en metafase como en anafase se nota un comportamiento similar en cuanto a la aparición de las aberraciones ya que en ambos casos éstos se presentan después de 12 horas de iniciado el tratamiento y son de tipo cromatídico, aunque

con los dos sistemas se observa una relación de concentración-efecto esta es mas clara en el análisis en metafase. Asimismo las frecuencias de aberraciones son mayores en esta última debido probablemente a que la observación es mejor ya que en anafase los fragmentos acéntricos pueden pasar desapercibidos (Kihlman, 1975). Sin embargo en este periodo es posible verificar el daño a nivel centromérico, expresado como cromosomas con el centrómero inactivado que se hacen muy evidentes en los tratamientos de 4 horas y 8 de recuperación, además de isocromosomas y anafases multipolares (Tabla V).

Un aspecto que debe considerarse en cuanto al uso de pesticidas es el de las medidas de seguridad para su manejo experimental y en personas ocupacionalmente expuestas a este tipo de sustancias, ya que en agricultura se utilizan en gran cantidad y su inhalación o contacto pueden ser peligrosos. En esta investigación se observa que el molinate aplicado a varias concentraciones afecta la estructura cromosómica de las células meristemáticas de la raíz de *Vicia faba* notándose que existe una relación concentración-respuesta, aunque estos datos no pueden ser extrapolados al hombre, es importante este tipo de estudios, ya que aportan evidencias sobre el daño genético que permiten la prevención de los riesgos.

REFERENCIAS

- Amer, S. M. 1974. Cytological effects of pesticides V. Effects of some herbicides on *Vicia faba*. *Cytologia* 39: 633-643.
- Barberá, C. 1976. Herbicidas Carbámicos En: *Pesticidas Agrícolas*. 3a. Ed., Omega, Barcelona. pp. 382-395.
- Bautz, E. y Freese, E. 1960. On the mutagenic effect of alkylating agents. *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.* 46: 1585-1599.
- Bender, M. A., Griggs, H.G. y Walker, P.L. 1973. Mechanisms of chromosomal aberrations production. I. Aberrations inductions by ultraviolet light. *Mutat. Res.* 20: 387-402.
- Brachet, J. 1975. *Introducción a la Embriología Molecular*, H. Blume, Madrid, pp. 125-692
- Brendel, M. y Ruhland, A. 1984. Relationship between functionality and genetic toxicology of selected DNA damaging agents. *Mutat. Res.* 133: 51-85.
- Casida, J., Kimmel, E. y Ohkawa, H. 1975. Sulfoxidation of tiocarbamate herbicides and metabolism of tiocarbamate sulfoxides in living mice and liver enzyme systems. *Pesticide Biochem. Physiol.* 5: 1-11.

- Chayarach, S. y Ratananum V. 1975. Acute toxicity of insecticides toxaphene and carbaryl and the herbicides propanil and molinate to four species of aquatic organisms. *Environ. Cont. Toxicol.* 14: 281- 284.
- Chen, H.H., Hsue, J.L., Sirianni, S.R. y Huang, C.C. 1981. Induction of sister chromatid exchanges and cell cycle delay treated with eight organophosphorus pesticides. *Mutat. Res.* 103: 307-313.
- Conger, A.D. 1965. The fate of metaphase aberrations. *Radiat. Bot.* 5: 81-96.
- Conger, A.D. y Fairchild, L.M. 1953. A quick-freeze method for making smear slides permanents. *Stain Technol.* 28: 281-283.
- Corbett, J.R. 1974. *Biochemical Mode of Action of Pesticides*. Academic Press. Londres y Nueva York p. 192.
- De Baun, I.R. y Bova, D.L. 1978a. Metabolism of (ring-C¹⁴) Ordram (molinate) in the rat. I. Balance and tissue residue study. *J. Agric. Food. Chem.* 26: 1-13.
- De Baun, I.R. y Bova, D.L. 1978b. Metabolism of (ring-C¹⁴) Ordram (molinate) in the rat. II. Urinary metabolite identification. *J. Agric. Food Chem.* 26: 13-17.
- Evans, H.J. y Scott D. 1964. Influence of DNA syntesis on the production of chromatid aberrations by x-rays and maleic hydrazide in *Vicia faba*. *Genetics* 49: 17-38.

Evans, H.J. 1966. Repair and recovery from chromosome damage after fractionated X-ray dosage. En: *General Aspects of Radiosensitivity: Mechanisms of Repair*, Int. Atomic Energy, Viena, pp. 31-48.

Fang, S.C. 1975. *Herbicides Chemistry Degradation and Mode of Action*. Marcell Dekker, Nueva York, pp. 323-348.

García-Lara, M.A. 1975. Efectos de la contaminación de las aguas. *IMIQ* 16: 14-19.

Gómez-Arroyo, S. y Villalobos-Pietrini, R. 1983. Chromosomal alterations induced by some chromium salts. *Cytologia* 48: 185-193.

Gómez-Arroyo, S. Baiza, A.M., López., G. y Villalobos-Pietrini, R. 1985. A comparative study of the cytogenetic effect of the insecticides heptachlor, malathion, and methyl parathion in *Vicia faba*. *Contam. Ambient.* 1: 7-16.

Grant, W.F., Zinov'eva-Stahevitch, A.E. y Zura, K.D. 1981. Plant genetic test systems for the detection of chemical mutagens. En: *Short-Term Test for Chemical Carcinogens* (H.F. Stick y R.H.C. San, Eds.), Springer-Verlag, Nueva York. pp. 200-216.

- Gray, R.A. 1969. *Chemistry degradation and mode of action of pesticides*. *Weed. Soc. Am. Abstr.* 174: 146.
- Guthrie, F.E. 1980. Pesticides and humans. En: *Introduction to Environmental Toxicology*. Guthrie, F.E. y Perry J.J. (Eds.), Blackwell Sci. Pub., Nueva York.
- Hartley, G.S. y West, T.F. 1969. *Chemicals for Pest Control*. Pergamon, Oxford. pp. 46-47.
- Helsot, H. 1977. Chemical mutagens. En: *Manual on Mutation Breeding*. International Atomic Energy Agency, Viena. pp. 51-54.
- Horvat, R. S. 1972. Microbial co-metabolism and the degradation of organic compounds in nature. *Bacteriol. Rev.* 36: 146-150.
- Hubell, J.P. y Casida, J.E., 1977. Metabolic fate dialkylcarbamoyl moiety of thiocarbamate herbicides in rats and corn. *J. Agric. Food Chem.* 25: 404-406.
- Imai, Y. y Kuwatsuka, S. 1982. Degradation of the herbicide molinate in plants. *J. Pesticide Sci.* 7: 481-484.
- Imai, Y. y Kuwatsuka, S. 1983. Uptake, translocation, and metabolic fate of the herbicide molinate in plants. *J. Pesticide Sci.* 9: 79-90.
- Imai, Y. y Kuwatsuka, S. 1986. Substrate specificity and induction of degrading activity for the herbicide molinate in three microbes isolated from soil. *J. Pesticide Sci.* 11: 563-572.

- Innes, J.R., Ulland, B.M., Valerio, M.G., Petrucelli, L., Fishbein, L., Hart, E.R. y Pallota, A.J. 1969. Bioassay of pesticides and industrial chemicals for tumorigenicity in mice: a preliminary note. *J. Natl. Cancer Inst.* 42: 1101-1114.
- Kaufman, D.D. 1967 Degradation of carbamate herbicides in soils. *J. Agric. Food Chem.* 15: 582.
- Kawatsu, I.M. 1977. Studies on the anemia of fish hemorrhagic anemia of carp caused by a herbicide molinate Bull. Japan. Soc. Sci. Fish 43: 905.
- Kay, K. 1974. Occupational cancer risk for pesticides workers. *Environ. Res.* 7: 243-247.
- Kihlman, B.A. 1966. *Action of Chemicals on Dividing Cells*. Prentice Hall, Nueva Jersey, p. 260.
- Kihlman, B.A. 1975. Root tips of *Vicia faba* for the study of the induction of chromosomal aberrations. *Mutat. Res.* 31: 401-412.
- Kihlman, B.A. 1977. *Caffeine and Chromosomes*, Elsevier, Amsterdam, p.304.
- Kihlman, B. A., Natarajan, A.T. y Anderson, H.C. 1978. Use of the 5-bromodeoxyuridine labelling technique for exploring mechanism involved in the formation of chromosomal aberrations. *Mutat. Res.* 52: 181-198.
- Koller, P.C. 1969. Mutagenic alkylating agents as growth inhibitors and carcinogens. *Mutat. Res.* 8: 199-206.

- Lawley, P.D. 1974. Some chemical aspects of dose response relationships in alkylation mutagenesis. *Mutat. Res.* 23: 283-295.
- Lay, M. y Menn, J. 1987. Amelioration of toxicity of molinate to Japanese carp (*Cyprinus carpio*) with selected dichloroacetamides. *Pesticide Biochem. Physiol.* 28: 149-154.
- Levan, A. 1938. The effects of colchicine in root mitosis in *Allium*. *Hereditas* 24: 471-486.
- Ma, T.H. 1979. Micronuclei induced by x-rays and chemical mutagens in meiotic pollen mother cells of *Tradescantia*. *Mutat. Res.* 64: 307-313.
- Ma, T.H. 1982. *Vicia* cytogenetics test for environmental mutagens. A report of the U.S. Environmental Protection Agency. Gene tox program. *Mutat. Res.* 99: 257-271.
- Marliac, J.P. 1979. Toxicity and teratogenic effects of 12 pesticides in the chick embryo. *Food Proc.* 35: 105-108.
- Nicoloff, H. y Becheff, K. 1976. Methods of scoring induced chromosome structural changes in barley. *Mutat. Res.* 34: 233-244.
- Nilan, R.A., Konzak, C.F. Heiner, R.E. y Frosse-Grettzen, E. 1963. Chemical mutagenesis in barley. *Proc. Int. Barley Genetics Symposium, Wageningen*, pp.35-54.

- Ochiai, T. y Kubota, S. 1978. Studies on toxic effects of pesticides on fish I. Toxic effects of the herbicide molinate on carp. *Bull. Fac. Fish Mic Univ.* 5: 129.
- Ong, V.Y. y Fang, S.C. 1976. Handbook Pesticides Stanford Research Institute, chemicals economics toxicol. *Appl. Pharmacol.* 25: 1565.
- Ramanna, M.S. y Natarajan, A.T. 1966. Chromosome breakage induced by alkylalkane-sulfonates under different physical treatment conditions. *Chromosoma* 18: 44-59.
- Savage, I.R.K. 1975. Radiation-induced chromosomal aberrations in the plant *Tradescantia*: dose response curves. I. Preliminary considerations. *Radiation Bot.* 15: 87-140.
- Schmid, W. 1975. The micronucleus test. *Mutat. Res.* 31: 9-15.
- Seiler, J. P. 1978. Herbicidal phenylalkylureas as possible mutagens. I. Mutagenicity test with some urea herbicides. *Mutat. Res.* 58: 353-359.
- Sikka, H.C. y Florezky, P. 1978. Mutagenic activity of thiocarbamate herbicides in *Salmonella typhimurium* J.Agric. Food Chem. 26: 146-148.
- Smialowiz, J. y Luebke, W.R. 1985. Evaluation of immune function in mice exposed to Ordram. *Toxicology* 37: 307-314.

- Strauss, B., Coyle, M. y Robbins, M. 1969. Consequences of alkylation for the behavior of DNA. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 163: 765-787.
- Szabo, L. Kalman, T.I. y Bradox, T.J. 1970. The reaction of 5-bromouracil derivates with sulfur nucleophiles, and a novel syntetic route to 5-sulfur-substituted uracils and nucleotides. *J. Org. Chem.* 35: 1434.
- Turkula, T.E. y Jalal, S.M. 1985. Increased rates of sister chromatid exchanges induced by the herbicides 2,4-D. *Heredity* 76: 213-214.
- Verly, W.G. y Brakier, L. 1970. Mecanisme moleculaire de L'action toxique des agents alkilants. *Rev. Europ. Etudes Clin. Et. Biol.* 15: 483-488.
- Verly, W.G. 1974. Comentary: Monofunctional alkylating agents and apurinic sites in DNA. *Biochem. Pharmacol.* 23: 3-8.
- Velominsky, J., Zadrazil, S., Pokormy, V., Gichner, T. 1973. Storage effect in barley. Changes in the amount of DNA lesions induced by methyl and ethyl metanesulphonates. *Mutat. Res.* 19: 73-81.
- Worthing, C.R. 1984. *The Pesticide Manual A World Compendium*. British Crop. Council, p. 382.
- Wright, S. J. 1978. *Pesticide Microbiology*. (I.R. Hill y S.J.L. Wright, Eds.). Academic Press, Londres pp. 26-30.

TABLA I. FRECUENCIA DE ALTERACIONES (-TESTIGO) PRODUCCION POR DIVERSAS CONCENTRACIONES DE MOLINATE CON 4 HORAS DE TRATAMIENTO Y 3 DE RECUPERACION

CONCENTRACION	#METAFASIS ANORMALES	FRAGMENTOS CROMATIDICOS E ISOCROMATIDICOS	ANILLOS CROMATIDICOS	% DE ABERRACIONES
25	0	0	0	0
50	0	0	0	0
100	0	0	0	0
200	0	0	0	0
300	0	0	0	0
400		MUERTE CELULAR		
500		MUERTE CELULAR		
1000		MUERTE CELULAR		

* SE ANALIZARON 200 CELULAS EN METAFASE PARA CADA CASO

TABLA 11. FRECUENCIA DE ALTERACIONES (-TESTIGO) PRODUCIDAS POR DIVERSAS CONCENTRACIONES DE NOLIMATE CON 4 HORAS DE TRATAMIENTO Y 9 DE RECUPERACION.

CONCENTRACION	#METAFASES ANORMALES	FRAGMENTOS CROMATIDICOS E ISOCROMATIDICOS	ANILLOS CROMATIDICOS	% DE ABERRACIONES
25	4	4	0	2.00
50	15	13	2	7.50
100	23	21	2	10.00
200		MUERTE CELULAR		

* SE ANALIZARON 200 CELULAS EN METAFASE PARA CADA CASO

TABLA III. FRECUENCIA DE ALTERACIONES (-TESTIGO) PRODUCIDAS POR DIVERSAS CONCENTRACIONES DE MOLINATE CON 4 HORAS DE TRATAMIENTO Y 14 DE RECUPERACION

CONCENTRACION	#METAFASES ANORMALES	FRAGMENTOS CROMATIDICOS E ISOCROMATIDICOS	ANILLOS CROMATIDICOS	% DE ABERRACIONES
25	2	2	0	1.00
50	8	7	1	1.50
100	32	30	2	13.50
200		MUERTE	CELULAR	

• SE ANALIZARON 200 CELULAS EN METAFASE PARA CADA CASO

TABLA IV. FRECUENCIAS DE ALTERACIONES (-TESTIGO) EN LOS CROMOSOMAS DE *Vicia faba* INDUCIDAS CON VARIAS CONCENTRACIONES DE MOLINATE DURANTE 4 HORAS DE TRATAMIENTO Y 2 DE RECUPERACION

CONCENTRACION (ppm)	ANAFASES TOTALES	% ANAFASES ANORMALES	% ABERRACIONES TOTALES	% CROMOSOMAS CON EL CENTROMERO INACTIVO	% ISOCROMOSOMAS	% ANAFASES MULTIPOLARES	% MICRONUCLEOS
25	536	0	0	0	0	0	2.1
50	1317	0	0	0	0	0	0.2
100	1402	0	0	0	0.05	0.52	0.6
200	865	0	0	0	0	0	0.5
300	1329	0	0	0	0	0	0

TABLA V. FRECUENCIAS DE ALTERACIONES (-TESTIGO) EN LOS CROMOSOMAS DE *Vicia faba* INDUCIDAS CON VARIAS CONCENTRACIONES DE MOLINATE DURANTE 4 HORAS DE TRATAMIENTO Y 8 DE RECUPERACION

CONCENTRACION (ppm)	ANAFASES TOTALES	% ANAFASES ANORMALES	% ABERRACIONES TOTALES	% CROMOSOMAS CON EL CENTROMERO INACTIVADO	% ISOCROMOSOMAS	% ANAFASES MULTIPOLARES	% MICRONUCLEOS
25	377	2.24	2.20	0.70	0	0	2.2
50	1066	2.46	1.17	1.70	0	1.12	0.5
100	298	8.43	4.94	4.12	0.24	0.58	
200				MUERTE CELULAR			
300				MUERTE CELULAR			

TABLA VI. FRECUENCIAS DE ALTERACIONES (-TESTIGO) EN LOS CROMOSOMAS DE *Vicia faba* INDUCIDAS CON VARIAS CONCENTRACIONES DE MOLINATE DURANTE 4 HORAS DE TRATAMIENTO Y 14 DE REDUPLICACION

CONCENTRACION (ppm)	ANAFASES TOTALES	% ANAFASES ANORMALES	% ABERRACIONES TOTALES	% CROMOSOMAS CON EL CENTROMERO INACTIVADO	% ISOCROMOSOMAS	% ANAFASES MULTIPOLARES	% MICRONUCLEOS
25	434	0.43	1.43	0.69	0	0.14	1.3
50	2873	3.45	2.77	1.40	0.08	0.59	0.7
100	3697	3.74	3.82	0.36	0.34	0.50	1.0
200							

MUERTE CELULAR

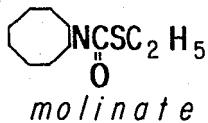


Figura 1. S-etil hexahidroazepina 1-Carbotionato.

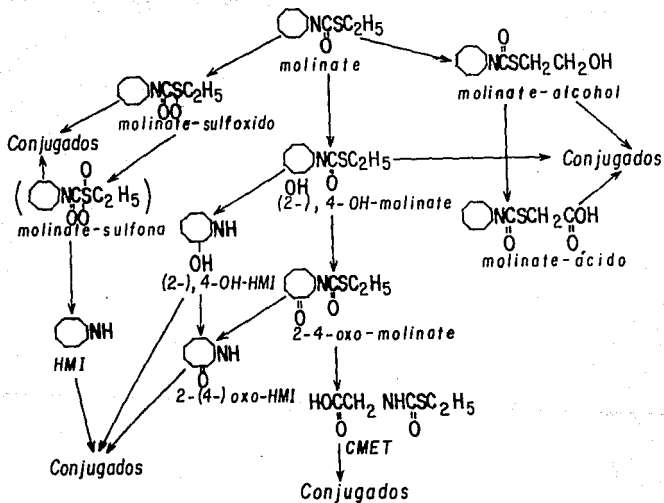


Figura 2 Posible vía metabólica de molinate en plantas.