

179
2ej



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

"EFECTO DEL DIURON SOBRE LA INDUCCION
DE MUTACIONES LETALES RECESIVAS
LIGADAS AL SEXO (SLRL) EN Drosophila
melanogaster".

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 :

DORA LIDIA RODRIGUEZ ZUÑIGA



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.

I N D I C E

	Pag.
RESUMEN	1
INTRODUCCION	2
MATERIAL Y METODOS	13
Sistema de cruzas	13
Via de administración	15
Procedimiento experimental	15
Medio de cultivo	16
Procedimiento estadístico	17
RESULTADOS	18
DISCUSION	19
BIBLIOGRAFIA	21
Figuras	30
Tablas	32
Grafica	38

RESUMEN

En el presente trabajo se estudió el efecto del Diuron sobre la inducción de mutaciones letales recesivas ligadas al sexo en Drosophila melanogaster utilizando el sistema de cruza de hembras Basc con machos silvestres (Oregon R), se empleó el sistema de camadas para conocer el efecto del herbicida en etapas postmeióticas de la gametogenesis del macho.

El Diuron se administró a los machos por inyección; las concentraciones empleadas fueron 10, 20 y 40 ppm siendo esta última la LD_{42} , como testigo se empleó dimetil sulfoxido (DMSO) al 1.5%.

Los resultados que se obtuvieron se evaluaron estadísticamente mediante las tablas de Kastenbaum - Bowman (1970), a un nivel de significancia del 5%. Solo se encontró significativo el número de letales de las camadas A y B a la concentración de 40 ppm, por lo que se puede concluir que el diuron actúa como agente directo, induciendo letales en espermatozoide maduro y espermátida.

INTRODUCCION

El hombre se ha esforzado por mejorar su calidad de vida, creando una amplia variedad de compuestos, entre los cuales destacan aquellos relacionados con la salud y la alimentación. Un claro ejemplo lo representa la producción de sustancias conocidas bajo el nombre genérico de pesticidas, entre los cuales encontramos a los herbicidas, fungicidas, nematicidas e insecticidas, que son capaces de controlar, eliminar, mitigar, prevenir y /o repeler, parásitos o plagas, que dañan directa o indirectamente al hombre (Ware, 1978). La falta de conocimiento en relación a la cantidad y consumo real que se debe hacer de éstos compuestos ha provocado daños a los ecosistemas ocasionando desequilibrios ecológicos.

En el mercado existen una gran cantidad de pesticidas que no se utilizan en forma racional, así en Estados Unidos en 1974 de las ventas totales, los pesticidas fueron del 35 al 45% y el resto de las ventas consistieron en artículos para el hogar y alimentos. En el mismo año, en Latinoamérica de las ventas totales el 40% fué de pesticidas, y el resto consistió en maquinaria y alimentos. La E.P.A. registró en 1976, 1200 pesticidas en el mercado, de los cuales 275 son herbicidas, 400 insecticidas, 200 fungicidas y nematicidas, 100 raticidas y 225 desinfectantes, siendo contemplados dichos productos en 30, 000 formulaciones que se expenden al público en general (Ware, 1978).

La mayoría de los pesticidas son sintéticos, por lo cual muchos de éstos no son degradados totalmente por procesos naturales, esto ocasiona que se vayan acumulando

do en la biosfera, provocando desequilibrios ecológicos lo que repercute en forma dañina ya sea directa o indirecta al hombre. Por ejemplo la F.A.O. calcula que el 50% del algodón producido por el mercado es tratado con insecticidas durante su cultivo (Ware, 1978); los residuos que le quedan, al entrar en contacto con el hombre, podrían perjudicarlo.

Se han encontrado residuos de pesticidas en los alimentos, en el agua, en los tejidos de plantas y animales, así como en los tejidos del hombre (Dustman y Stickel, 1969) este hecho es ya un alto indicador de que se está contaminando el ambiente con estos compuestos, por lo cual es necesario conocer la naturaleza de cada pesticida y estudiar sus efectos en el ambiente.

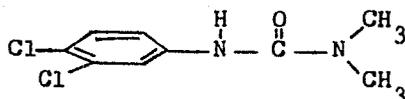
Dentro de los pesticidas, los herbicidas atacan a las malas hierbas ya sea de un modo general, o de forma selectiva, dejando indemne el cultivo y destruyendo total o buena parte de las hierbas adventicias, su uso se ha incrementado puesto que disminuye el costo de la mano de obra y el tiempo empleado en el cultivo es menor (Barbera, 1976).

Los herbicidas se clasifican en inorgánicos y orgánicos, dentro de estos últimos encontramos a los derivados de la urea ($H_2N - CO - NH_2$) denominados herbicidas uréicos (Barbera, 1976; Ware, 1978). La forma de actuar de éstos herbicidas consiste en sustituir parcial o totalmente los H^+ de los grupos $-NH_2$ por radicales orgánicos de otra naturaleza.

Este tipo de herbicidas ataca preferentemente raíces, aunque también puede atacar por contacto a las malas hier

bas, esto hace que el producto sea utilizado para atacar hierbas ya emergidas, en estado juvenil y con crecimiento activo; aunque también puede inhibir la emergencia y crecimiento, produciendo plantas cloróticas, necrosis de tejidos y muerte. Su mecanismo de acción es por inhibición indirecta de la fotosíntesis, impidiendo que se realice la reacción de Hill (Barbera, 1976; Ware, 1978).

Dentro de los herbicidas uréicos tenemos al Diuron: 3-(3,4-diclorofenil)-1,1-dimetilurea; 1,1-dimetil-3-(3,4-diclorofenil)urea; su nombre comercial es: Diuron, Kar mex, Telvar o Urox D. Su peso molecular es de 233.10 gr. y contiene 46.37% de C, 4.32% de H, 30.42% de Cl, 12.02% de N y 6.86% de O. Su fórmula es:



Es soluble en agua a 25°C hasta 42 ppm y poco soluble en solventes hidrocarbonados. Su presión de vapor a 50°C es de 3.1×10^{-6} mmHg (Index Merck, 1978).

Los niveles de toxicidad por Diuron (LD_{50}) son muy variados, por ejemplo para ratas es de 437 ppm; en codorniz, más de 5000 ppm; para la trucha arcoiris 4.30 ppm; 1.4 ppm para Daphnia sp.; para Fasciola hepatica 13.2 mgkg⁻¹; en Lymnea sp. 28.6 ppm; para Rhodopseudomonas shaeroides 5.8 ppm; para el maíz es de 8 ppm y por último, 4 ppm para el sorgo (Brown, 1978; Index Merck, 1978; Christian y Tate, 1983; Sutton et al., 1984).

Se ha observado que dosis repetidas de diuron en ratas, produce anemia y metahemoglobinemia si los compues

tos son hidrolizados "in vivo" a dicloroanilina (Index Merck, 1978).

Este compuesto es utilizado como preemergente y como herbicida selectivo de viñedos, olivos, frutales de pepita, espárragos, alfalfa, clavel, alcachofa, y para el deshierbo total del área a tratar (Barbera, 1976; Food and Drug Act, 1977). También se utiliza para el control de plantas de manzana, limón, olivo, naranja, tangerina, toronja, pera, nuez, sorgo, maíz y centeno (Horowitz, 1970).

Majka y Lavy (1977) sugieren que sólo se utilice diuron para combatir plantas en crecimiento. Se ha demostrado que el diuron también es efectivo si es combinado con otros herbicidas; así, la simacina y el diuron son efectivos para hierbas anuales y perennes (Horowitz, 1970); el trifluralin combinado con el diuron es efectivo para eliminar hierbas anuales (Hamilton y Arle, 1975); y el monodiuron combinado con el diuron se utiliza como herbicida selectivo (Brown, 1978).

Se ha observado que el diuron sirve para combatir hongos dañinos como Cercospora herpotrichoides (Brown, 1978); y también ataca, inhibiendo el ciclo de vida de Lymnaea sp. lo cual es muy importante, ya que éste organismo representa un paso en el ciclo de vida de Fasciola hepatica que es parásito del ganado, y otros mamíferos, incluyendo al hombre (Christian y Tate, 1983).

En algunos países ya se ha empezado a controlar la dispersión de este compuesto que aunque aporta beneficios, en grandes cantidades perjudica, por ejemplo en Canadá los niveles permitidos del diuron son de 7 ppm

para esporangios y 1 ppm para frutas cítricas, cereales, viñedos, cultivos de papa y piña, así como para trigales (Food and Drug Act, 1977).

La adsorción del diuron es baja en minerales arcillosos limpios de materia orgánica (Pillay y Tchan, 1971; Mustafa y Gamar, 1972), mientras que aumenta en áreas donde hay cationes orgánicos sintéticos como NR_4^+ (Smith y Bayer, 1967; Peck et al., 1980); y en sedimentos con textura fina y con gran cantidad de materia orgánica -- (Majka y Lavy, 1977; Nkedi-kizza et al., 1983). Se ha encontrado que el Diuron cuando está en solución en el agua, es adsorbido hasta un 50% por el terreno penetrando hasta 2 cm. de profundidad (Grover, 1975), y que las partículas de carbón comercial en el sedimento, influyen para que el diuron en solución con el agua sea adsorbido eficazmente y ese mismo efecto se observa con el carbón producido por Paspalum dilatatum (Toth y Milham, 1973).

El diuron es soluble en agua a pH 6, e insoluble -- cuando el agua se encuentra a un pH de 8 y 9, esta interacción se ha registrado cuando se encuentra el compuesto en presencia de la enzima superoxi dismutasa (SOD) perteneciente a Escherichia coli (Giannopolitis y Ries, - 1977).

Se ha observado que el diuron se degrada en el terreno o sustrato que lo contiene, dependiendo de las características de este último, por ejemplo en suelos integrados por partículas menores o iguales a 2 000 μm y conteniendo una concentración de 3.34 ppm de carbono orgánico, éste compuesto después de 20 semanas, empieza a de-

gradarse por medio de descomposición microbiana (Dalton et al., 1966; McCormick y Hiltbold, 1966; Murray et al., 1969; Brown, 1978; Attaway et al., 1982).

Cuando el diuron es esparcido en sustratos conteniendo 1 ppm de carbón como mínimo, es desactivado quedando el terreno limpio de éste herbicida (Toth y Milham, 1973; Jordan y Smith, 1971).

Brown (1978) ha observado que el diuron tiene una persistencia en el suelo de 3 a 6 meses y a los 8 meses el compuesto activo ha decrecido hasta un 75% de la dosis original. Ellis y Camper (1978) han observado que los microorganismos acuáticos son capaces de degradar el diuron, cuando es arrojado a su habitat.

Así mismo se ha visto que el hongo Cunninghamella echemulata es capaz de degradar este herbicida por medio de dealquilación oxidativa (Tillmanns et al., 1978).

El diuron también puede ser degradado en el sustrato que contenga peróxido de hidrógeno, lo cual contribuye a que no pueda ser absorbido por el terreno, este mecanismo también se presenta en suelos donde se ha quemado hierba y donde hay restos de cenizas (Pillay y Tchan, 1971; Mustafa y Gamar, 1972).

Attaway et al. (1982) proponen una degradación del compuesto por medio de microorganismos aeróbicos y anaeróbicos (Figura 1).

La amplia distribución ambiental que hay de los pesticidas en la actualidad, es nociva para el hombre y por ello Kennedy et al. (1972); Holloman con su grupo (1976); Ahling y Wiberger (1979); y por último Gomez et al. (1982)

han propuesto que en las ciudades industriales se realice la destrucción termal de estos productos que se encuentran en exceso, el método consiste en someterlos a una atmosfera de helio a temperatura de $1\ 000^{\circ}\text{C}$, y los productos que se obtienen de dicha destrucción, son compuestos que pueden ser reutilizados por la naturaleza, estos son: H_2 , N_2 , CO , CH_4 , CO_2 , C_2H_4 , C_2H_6 , HCl , HCN , y Aminas.

En relación con la fitotoxicidad del diuron, se ha observado que es directamente proporcional a la concentración en solución que haya de este en el sustrato, y se ha visto que cuando hay una alta concentración de carbón en el área donde es aplicado es desactivado, y por lo tanto su fitotoxicidad también es anulada (Ahrens, - 1964; Sheets y Harris, 1965; Toth y Milham, 1973).

Browmer y Adeney (1978) observaron que la fitotoxicidad del diuron puede anularse hasta un 93% en medio acuático; así mismo Geissbuhler (1969) encontró que esta fitotoxicidad también puede ser anulada por medio de dimetilaciones e hidroxilaciones que puede sufrir el compuesto por la acción del medio en general.

El mecanismo de acción del diuron en las malas hierbas, es el de inhibir la fotosíntesis ya que impide que se realice la reacción de Hill en el cloroplasto, lugar donde los electrones, que por efecto del compuesto activo del herbicida, se combinan con las moléculas de agua, produciendo iones libres de H^+ y de $\text{O}^{\ominus\ominus}$ e inhibiendo así la síntesis de ATP y de NADPH, por lo cual la planta muere al no poder fijar el CO_2 atmosférico (Butler, 1962; Buechel, 1972; Orr et al., 1976; Brown, 1978; Matoo et

al., 1981; Suzuki y Casida, 1981; Devlin et al., 1983; Ridley, 1983) (Figura 2).

Al realizar experimentos con microorganismos, para observar el efecto del diuron en ellos, se ha encontrado que en Saccharomyces cerevisiae este compuesto inhibe el transporte de electrones entre los citocromos mitocondriales b y c (Convent et al., 1978), e inhibe la fosforilación oxidativa (Mangat et al., 1974). Se ha visto - que en Chlorella sp. este herbicida también produce inhibición de la respiración celular (Sargent y Taylor, 1972). Burger y Klaus (1981) al hacer investigaciones con Schizosaccharomyces pombe encontraron que el diuron induce una fuerte reducción del citocromo b mitocondrial.

Shabir y Fletcher (1980), encontraron que el diuron induce el cierre de estomas y por ende reduce la transpiración en el maíz.

Existe una amplia variedad de daños causados por el diuron, debido al uso indiscriminado que se hace de él, dichos daños van desde la contaminación de cultivos cuando son irrigados con el agua que contiene el herbicida, hasta el daño directo causado a los peces e invertebrados habitantes de estas aguas (Johnson y Julin, 1974). El daño provocado a los cultivos se evitaría si la primer descarga de agua contaminada con diuron se vertiera directamente al drenaje (Browmer y Adeney, 1978).

Se ha visto que el daño provocado por el diuron va más allá del lugar en que fué esparcido, un ejemplo de esto se presentó en Australia donde el agua contaminada con el herbicida, también fué utilizada para el riego y uso doméstico (Kathleen y Adeney, 1978).

Christian y colaboradores (1985) encontraron que el diuron es capaz de inhibir el desarrollo embrionario de Fasciola hepatica, además se ha encontrado que este herbicida es inductor de mutaciones, así por ejemplo encontramos que produce conversión génica en Saccharomyces cerevisiae (Claisse et al., 1978; Convent et al., 1978; Colson y Slonimski, 1979), en Schizosaccharomyces pombe (Burger y Klaus, 1981); induce reversión génica en Nostoc muscorum (Vaishampayan, 1983), en Chlamydomonas reinhardi (Lien et al., 1977; McBride et al., 1977; Galloway y Mets, 1984), en Rhodospseudomonas sp. (Sutton et al., 1984) y en Monoraphidium pusillam (Lundegardh, 1985).

Mangat (1979) encontró que el diuron es capaz de reducir la poza génica de los nucleótidos de las plantas de maíz.

Debido al elevado índice de contaminación en que vivimos, el hombre ha desarrollado técnicas de bioensayo las cuales ayudan a detectar las sustancias que pueden ser perjudiciales para la salud (Mayer y Flam, 1975). Estos bioensayos o sistemas de prueba utilizan diversos organismos como: bacterias, hongos, plantas, insectos y mamíferos; con ellos se pueden detectar algunos tipos de daños genéticos, como aberraciones cromosómicas o mutaciones génicas; el costo y el tiempo de duración de cada prueba varía dependiendo del sistema que se emplee (Tabla 1); el sistema de prueba con Drosophila melanogaster destaca, pues es un eucarionte, el costo de la prueba es moderado, y es el único en que se puede detectar todo tipo de daño genético inducido (Environ. Mutag. Soc., 1975) (Tabla 2).

El ciclo de vida de Drosophila melanogaster es corto, dura aproximadamente 10 días a una temperatura de 25°C y a una humedad relativa de 60%; este ciclo consiste básicamente en: Huevo (1 día), larva de primer estadio (1 día), larva de segundo estadio (1 día), larva de tercer estadio (2 días), pupa (de 4 a 5 días), imago -- (aproximadamente 8 horas) (Demerec, 1965). Además es el eucarionte mejor conocido genéticamente, no ocupa mucho espacio, deja gran descendencia y algo muy importante, es un sistema in vivo (Zimmering, 1976).

Drosophila melanogaster tiene cuatro cromosomas perfectamente mapeados, existen numerosas cepas con variedad de marcadores fenotípicos y es posible detectar a través de sistemas de cruce específicos, inducción de : mutaciones letales recesivas ligadas al sexo, mutaciones letales dominantes, pérdida parcial o total de cromosomas sexuales y autosómicos, translocaciones y no disyunción; así como recombinación somática (Abrahamson y Lewis, 1971; Zimmering, 1987).

Las vías de administración de los compuestos pueden ser por alimentación de la larva o del adulto, por inyección, por vía gaseosa o por ducha vaginal (Lee, 1976).

Chandley y Bateman (1962) determinaron claramente los diferentes estadios de la línea germinal de los machos de Drosophila melanogaster: espermatozoide (día 1 y 2), espermátida tardía (día 3 al 5), espermátida temprana (del día 6 al 8), espermatozito (del día 8 al 15), espermatogonia (del día 15 al 18), las que pueden muestrearse por el sistema de camadas.

Baars et al. (1980) encontraron que en la espermáti-

da temprana y en el espermatocito tardío se encuentra el retículo endoplásmico bien desarrollado en el que se localiza una fracción enzimática microsómica análoga al paquete enzimático del hígado de mamíferos, lo que confiere otra ventaja importante al sistema de prueba; gracias a ello es posible determinar si el agente que se está probando induce el daño por sí mismo (directo) o si el compuesto necesita ser metabolizado para poder producir daños genéticos a través del metabolito secundario (indirecto) (Vogel y Sobels, 1976).

En el presente trabajo se valoró el efecto del diuron, sobre la inducción de mutaciones letales recesivas ligadas al sexo en Drosophila melanogaster, empleando el sistema de camadas.

MATERIAL Y METODOS

Sistema de cruzas.

Para valorar la inducción de mutaciones letales recesivas ligadas al sexo (SLRL), se empleó el sistema de cruzas Müller 5, o Basc, las hembras son de la línea Basc y se cruzan con machos silvestres Oregon R.

Las hembras Basc presentan varios marcadores fenotípicos en el cromosoma X: $In(1)sc^{81L}sc^{8R} + S,sc^{81}sc^8$, (1: 0.0), que afecta el número y forma de algunas cerdas supra alares y estenopleurales, es recesivo y es un inhibidor de la recombinación dado que porta varias inversiones; w^a (white-apricot, 1: 1.5), que codifica para ojos color durazno, y es recesivo; B (Barra, 1: 57.0) que de nota el ojo en forma de barra y es dominante (Lindsley y Grell, 1968).

Los machos son silvestres para todos los marcadores fenotípicos.

Esta cruce nos permite valorar en la segunda generación a individuos que son letales y los que no lo son, por medio del fenotipo que presenten.

P



Hembras Basc (ojos en barra, color durazno).



Machos silvestres tratados.

F₁



Hembras con ojo color rojo, en forma de muesca.



Machos Basc

P₂(F₁ x F₁)



x



F₂



Hembras ojo musca, silvestres.



Hembras Basc



Machos Basc



Machos silvestres

Si se induce un letal los machos silvestres de la F₂ no aparecen. Para comprobar la inducción de esta mutación se deja que emerja la F₃ de hembras Basc/+ contabilizando el número de ellas, si hay más de 15 y ningún macho silvestre, o si hay una proporción 20:1 de estas hembras con respecto al macho, entonces es un letal (Woodruff et al., 1985).

Vía de administración.

La vía de administración que se empleó fué la de inyección en el tercer segmento lateroventral a machos no mayores de 48 horas de edad. Las microjeringas empleadas para administrar el diuron fueron elaboradas con pipetas pasteur, afinandolas de la punta con ayuda de un micro-mechero y colocando un bulbo de goma en el extremo de la jeringa para poder inyectar la solución.

Procedimiento experimental.

El diuron empleado en el experimento, es el de la fórmula comercial, con 80% de pureza (Du Pon, S.A. de C. V.). En pruebas preliminares se estableció la LD_{42} , que equivale a 40 ppm, y es la concentración en la cual a las 48 horas, el 42% de los machos tratados mueren; además se probaron dos concentraciones por debajo de ésta; 20 y 10 ppm. Debido a las propiedades de solubilidad del diuron se disolvió en Dimetil sulfoxido (DMSO) al 1.5 %, el testigo correspondió a DMSO al 1.5%.

Se trataron 100 machos por concentración, y 100 para el testigo, cada macho fué numerado y colocado en un vial con hembras virgenes Basc en una proporción 1:3, en un lapso de tiempo de 0 a 2 días, siendo esto, la camada A; después de este tiempo los machos fueron colocados con nuevas hembras en igual proporción quedando de los 3 a los 5 días del tratamiento, esto corresponde a la camada B; al 6^o día fueron transferidos los machos con nuevas hembras virgenes quedando hasta el día 7, lo que representa la camada C. A los 6 días de sembrada cada camada se mataron los progenitores para evitar confundir-

los con la F_1 . A los 15 días se revisó la progenie de cada vial, de los cuales se sembró una pareja por vial, (hembra Basc/+ y macho Basc/Y), formando familias numeradas, las hembras que no alcanzaron pareja se sembraron solas de igual forma 1 por vial. Se siguió el mismo procedimiento para cada camada. A los 18 días de sembrada cada camada se procedió a leer la F_2 , cuando había macho(s) silvestre(s) se cuantificó como evento normal, y en los casos en que no lo hubo, se procedió a sembrar en un vial todas las hembras Basc/+ y se esperó a que emergiera la F_3 para cuantificar el número de hembras Basc/+ y de machos silvestres. En los casos en que se encontraron más de 15 hembras Basc/+ y ningún macho silvestre, se cuantificó como evento letal, pero si se encontraba macho(s) silvestre(s) se cuantificaba como normal, excepto cuando había hembras Basc/+ y machos silvestres en proporción 20:1 en cuyo caso se cuantificó como letal (Woodruff et al., 1985).

Medio de cultivo.

Para preparar un litro de medio de cultivo, se pusieron en un recipiente 1150 ml. de agua, 12 gr. de agar (Merck), 48 gr. de azúcar, 35 gr. de harina de maíz (Minsa), cuando empieza a hervir se le agregan 15 gr. de fécula de maíz disuelta en 100 ml. de agua, se deja hervir durante 15 minutos, y entonces se añade a la mezcla 12 gr. de levadura de cerveza disuelta en 160 ml. de agua, se deja hervir durante 15 minutos, se retira del fuego se enfría hasta 60°C , y se agregan 4 ml. de ácido propiónico (Sigma), e igual volumen de nipagin al 10%.

Los cultivos de Drosophila melanogaster se mantuvieron a una temperatura constante de $25 \pm 1^{\circ}\text{C}$.

Procedimiento estadístico.

Se realizó 1 experimento y 2 repeticiones evaluando estadísticamente los resultados por medio de las tablas de Kastenbaum - Bowman (1970), con un nivel de significancia del 5%.

RESULTADOS

Para valorar la producción de mutaciones por diuron, se analizó el fenotipo de la progenie perteneciente a la F_2 y F_3 , la cual proviene de la cruce original de machos silvestres (Oregon R) tratados, con hembras Basc.

En la tabla 3 se observan los resultados obtenidos en la camada A, que registra el efecto producido desde el momento de la inyección del compuesto al individuo, hasta los 2 días. De los letales obtenidos en esta camada, solo resultó significativo el valor que se obtuvo - para 40 ppm de diuron. Este mismo efecto se obtuvo para la camada B (del día 3 al 5), representado en la tabla 4, donde el valor significativo de letales fué el que - se recobró para 40 ppm.

La tabla 5 muestra los resultados obtenidos en la camada C (del día 6 al 7), en el cual los valores de letales obtenidos de las 3 concentraciones no son significativos con respecto al testigo.

Por último, la tabla 6 y la gráfica 1 resumen los - datos anteriormente citados, donde se observa que solo con 40 ppm de diuron se produjeron daños significativos en las camadas A y B; el nivel de significancia tomado para analizar estadísticamente los datos fué al 5% de a cuerdo con las tablas de Kastenbaum - Bowman. También se puede observar una disminución en la producción de letales a 20 ppm, aunque estos datos no son significativos con respecto al testigo.

DISCUSION

El empleo de Drosophila melanogaster para pruebas de mutagénesis se ha venido desarrollando desde 1927, cuando H. J. Muller desarrolló la prueba de letales recesivos ligados al sexo, para valorar los efectos inducidos por los rayos X. A medida que ha evolucionado la ciencia, se ha perfeccionado esta prueba, actualmente se emplean machos silvestres tratados, y se cruzan con hembras Basc. Esta prueba es muy sensible, detecta mutaciones puntuales, deleciones pequeñas y aberraciones cromosómicas, muestreandose el 80% de los loci del cromosoma X, es decir, una quinta parte del genoma (Zimmering, 1976; Lee, 1983).

Los daños del DNA pueden deberse principalmente al efecto de sustancias químicas, que pueden interactuar con los ácidos nucleicos como agentes oxidantes, alquilantes, intercalantes o análogos a bases (Watson, 1978).

Tanto en la camada A como en la B, el diuron fué capaz de inducir letales sólo en la concentración más alta (40 ppm) por lo que actuó como un agente directo - ya que su actividad fué en las etapas postmeióticas, en la camada A el daño genético se indujo en espermatozoide maduro, y en la camada B, las mutaciones se produjeron principalmente en espermatozoides tempranos y espermátidas tardias (Valencia, 1984).

En la camada C no se produjo daño genético significativo en todas las concentraciones probadas (10, 20 y 40 ppm), esta camada corresponde a espermátidas tempranas, en estas células el retículo endoplásmico funciona

para metabolizar ya sea por activación o degradación de los compuestos que llegan a su alcance por lo cual los metabolitos del diuron no son capaces de inducir letales como los produce el compuesto por sí mismo.

El diuron es un agente mutagénico en Drosophila melanogaster, al igual que en: Chlamydomonas reinhardi (Lien et al., 1977; McBride et al., 1977; Galloway y Mets, 1984); Saccharomyces sp. (Claisse et al., 1978; Convent et al., 1978; Colson y Slonimski, 1979); Schizosaccharomyces pombe (Burger y Klaus, 1981); Nostoc muscorum (Vaishampayan, 1983); Rhodospseudomonas sp. (Stton et al., 1984) y Monoraphidium pusillam (Lundegardh, 1985); por lo cual este herbicida debe manejarse con precaución y en forma limitada ya que su uso indiscriminado representa un riesgo para las poblaciones que están expuestas al diuron.

Debe hacerse hincapie que en países como México, el uso indiscriminado de pesticidas contribuye en gran medida a la contaminación ambiental, por lo que la venta y empleo en forma apropiada del diuron debe incluirse en el reglamento sobre uso de pesticidas recientemente emitido por SEDUE.

BIBLIOGRAFIA

- Abrahamson, S. y E.B. Lewis (1971). The detection of mutations in Drosophila melanogaster En: Chemical mutagens. Principles and methods for their detection. Hollander A. Ed. Vol. 2, Plenum Press. Nueva York. P.p. 461-487.
- Ahling, B. y K.J. Wiberger (1979). Incineration of pesticides containing phosphorus. J. Environ. Qual. 8:12-13.
- Ahrens, J.F. (1964). Antidote for herbicides. Frontiers of Plant. Sci. 17: 5-7.
- Attaway, H.H.; N.D. Camper y M.J.B. Paynter (1982). Anaerobic microbial degradation of Diuron by pond sediment. Pest. Bioch. 17: 96-101.
- Baars, A.J.; G.H. Blijleven; G.R. Mohn; A.T. Natarajan y D.D. Breimer (1980). Preliminary studies on the ability of Drosophila microsomal preparations to activate mutagens and carcinogens. Mutat. Res. 72: 257-264.
- Barbera, C. (1976). Pesticidas agrícolas. Editorial Omega. Pag. 9-45, 399-412.
- Bowmer, K.H. y J.A. Adeney (1978). Residues of Diuron and phytotoxic degradation products in aquatic situations. 2. Diuron irrigation water. Pest. Sci. - 9: 354-364.
- Brown, A.W.A. (1978). Ecology of pesticides. John Wiley & Sons. Estados Unidos. 437 p.p.
- Buechel, K.H. (1972). Mechanisms of action and structure activity relations of herbicides that inhibit -

- photosynthesis. Pestic. Sci. 3: 89-100.
- Burger, G. y W. Klaus (1981). Mitochondrially inherited resistance to antimycin and diuron in the petite negative yeast Schizosaccharomyces pombe. Mol. Gen. Genet. 181: 134-139.
- Butler, P.A. (1962). Effects of pesticides on fish and wildlife in 1960. U.S. Fish Wildl. Serv. Circ. 145: 20.
- Claisse, M.L.; A. Spyridakis; M.L. Wambierkluppel; M.L. Pajot y P.P. Slonimsky (1978). Mosaic organization and expression of mitochondrial DNA region controlling cytochrome c reductase and oxidase. II. Academic Press. Nueva York. p.p. 127.
- Golson, A. y P.P. Slonimski (1979). Genetic localization of diuron and mucidin-resistant mutants relative to a group of loci of the mitochondrial DNA controlling coenzyme QH₂-cytochrome c reductase in Saccharomyces cerevisiae. Mol. Gen. Genet. - 167: 287-288.
- Convent, B.; M. Briquet y A. Goffeau (1978). Kinetics evidence for two sites in the inhibition by diuron of the electron transport the bc segment of the respiratory chain in Saccharomyces cerevisiae. Env. J. Biochem. 92: 137-145.
- Chandley, A.C. y A.J. Bateman (1962). Timing of spermatogenesis in Drosophila melanogaster using triitated thymidine. Nature, 20: 299-300.
- Christian, F.A. y T.M. Tate (1983). Toxicity of fluometuron and diuron on the intermediate snail host - (Lymnea spp.) of Fasciola hepatica. Bul. Environ.

- Contam. Toxicol. 30: 628-631.
- Christian F.A.; M.T. Tate; T. Tesfamichael y C. Le Blanc (1985). Effects of MSMA y diuron on embryo development and hatching of Fasciola hepatica miricidia. Env. Pollu. A. 38: 1-7.
- Dalton, R.L.; A.W. Evans y R.C. Rhodes (1966). Disappearance of diuron from cotton field soils. Weeds. 14: 31.
- Demerec, M. (1965). Biology of Drosophila. Hamfner Publ. Co. Nueva York y Londres.
- Devlin, R.M.; A.J. Murkowski; I.I. Zbiec; S.J. Karczarczyk y E.M. Skorska (1983). Influence of buthida zole, diuron and atrazine on some light reactions of photosynthesis. Weed Sci. 31: 879-883.
- Dustman, H.E. y L. Stickel (1969). Occurrence and significance of pesticide residue in wild life. Ann. - Nueva York. Acad. Sci. 160: 2.
- Ellis, P.A. y N.D. Camper (1978). Degradation of the herbicide diuron by pondwater and pond sediment microorganisms. Weed Soc. Amer. Abstr. p p. 108.
- Environmental Mutagen Society (1975). Environmental mutagenic hazards. Science. 187: 503-514.
- Food and drug act, and regulations (1977). Table II, Agricultural Chemicals. Department of National Health and Welfare, Queen's Printer and controller of Stationery, Ottawa, Canada. p p. 347.
- Galloway, R.E. y L.J. Mets (1984). Atrazine, bromacil and diuron resistance in Chlamydomonas. Plant. Physiol. 74: 469-474.
- Geissbuhler, H. (1969). In degradation of herbicides. -

Marcel Dekker, Nueva York. Pag. 89.

- Giannopolitis, G.N. y S.K. Ries (1977). In vitro production of superoxi radical from paraquat and its interactions with monuron and diuron. *Weed Sci.* 25: 298-303.
- Gomez, J.; C. Bruneau; N. Soyer y A. Brault (1982). Indentification of termal-degradation products from diuron and iprodione. *J. Agr. Food.* 30: 180-182.
- Grover, R. (1975). Adsorption and desorption of urea herbicides on soils. *Can. j. Soil. Sci.* 55: 127.
- Hamilnton, K.C. y H.F. Arle (1975). Preplanting applications of diuron with and without trifluralin in cotton. *Weed Sci.* 23: 75-77.
- Holloman, M.E. ; F.Y. Hutto; M.V. Kenedy y C.R. Swanson (1976). Degradation of selected chlorinated herbicides. *J. Agric. Food Chem.* 24: 1194-1198.
- Horowitz, M. (1970). Herbicidal effect of diuron and simazine on anual and perennial grasses. *Isr. J. Agr. R.* 20: 163.
- Index Merck (1978). Merck & CO., Inc. E.U.A. 3400 pp.
- Johnson, W.W. y A.M. Julin (1974). A review of the literature of use of diuron in fisheries fish and - wildlde. *Water Qual. Crit. Washinton, D.C.* pp.35.
- Jordan, P.D. y L.W. Smith (1971). Adsorption and deactivation of atrazine and diuron by charcoals. *Weed Sci.* 19: 541-544.
- Kastenbaum, M.A. y K.O. Bowman (1970). Tables for determining the statistical significance of mutation frequencies. *Mutat. Res.* 9: 527-549.
- Kathleen, H.B. y J.A. Adney (1978). Residues of diuron -

- and phytotoxic degradation products in aquatic situations II. Diuron in irrigations water. Pestic. Sci. 9: 354-364.
- Kennedy, M.V.; B.J. Stojanovic y F.L. Shuman (1972). Analisis of decomposition products of pesticides. J. Agric. Food. 20: 341-343.
- Lee, W.R. (1976). Chemical mutagenesis. En: The genetic and biology of Drosophila. Asburner, M. y E. Novitsky editores. Academic Press Inc. LTD. Londres pp. 1299-1341.
- Lee, W.R.; S. Abrahamson; R. Valencia; E.S. Von Haile; F.E. Würgler y S. Zimmering (1983). The sex-linked - recessive lethal test mutagenesis in Drosophila melanogaster. A report of the U.S. Environmental Protection Agency Gene-Tox Program. Mutat. Res. 123: 183-271.
- Lien, S.; J.C. Mc Bride; R.K. Togasaky y A. Sanprietto -- (1977). A comparative studie of photosystem II specific inhibitors: the differential action on a DCMU resistant mutant strain of Chlamidomonas reinhardi. Plant Cell Physiol. Special Issue. 3: 243-256.
- Lindsley, D.J. y E.H. Grell. (1968). Genetic variations of Drosophila melanogaster. Carnegie Institution of Washinton Publ. Washinton. 472 pp.
- Lundegardh, B. (1985). Differences in photosynthesis between a diuron-resistant, and atrazine-resistant and a susceptible biotype of the green-alga Monoraphidium pusillum. (PRINTZ). Physl. Plant. 64: A10.

- Majka, J.T. y T.L. Lavy (1977). Adsorption, mobility and degradation of cyanazine and diuron in soils, - Weed Sci. 25: 401-406.
- Mangat, B.S.; W.B. Levin y R.G.S. Bidwet (1974). The extent of dark respiration in illuminicence leaves and its control by ATP leves. Canad. J. Bot. 52: 673.
- Mangat, B.S. (1979). The effect of diuron on the soluble nucleotide pool and growth of bean and corn seedlings. Pesticide Bioch. and Physiol. 10: 251-258.
- Mattoo, A.K.; U.Pick; H.Hoffman-Falk y M. Edelman (1981). The rapidly metabolized 32,000-dalton polypeptide of the chloroplast is the "preteinaceous shield" regulating photosystem II electron transport and mediating diuron herbicide sensitivity. P. - Nas. Biol. 78: 1572-1576
- Mayer, V.W. y W.G. Flam (1975). Legislative and technical aspects of mutagenicity testing. Mutat. Res. 29: 295-300.
- McBride, J.C.; A.C. McBride y R.K. Togasaky (1977). Isolation of Chlamydomonas reinhardi mutants resistant to the herbicide, DCMU. Plant. Cell Physiol. 3: 239-241.
- McMormick, L.L. y A.E. Hiltbold (1966). Microbial decomposition of atrazine and diuron in soil. Weed - Sci. 14: 77-81.
- Murray, D.S.; L.R. Riesck y J.W. Lyund (1969). Microbial degradation of five substituted ureas herbicides. Weed Sci. 17: 52-55.

- Mustafa, Ma. y Y. Gamar (1972). Adsorption and desorption of Diuron as a function of soil properties. *Soil. Sci. So.* 36: 561.
- Nkedi-kizza, P.; P.S.C. Rao y W.J. Johnson (1983). Adsorption of diuron and 2,4,5-T on soil particle-size separates. *J. Environ. Qual.* 12: 195-197.
- Orr, A.R. ; J.E. Kessler y E.R. Tepaske (1976). DCMU induced inhibition of growth, photosynthesis and motility in Eudorina elegans cultures. *Amer. J. Bot.* 63: 973.
- Peck, D.E.; D.L. Corwin y W.J. Farmer (1980). Adsorption desorption of diuron by fresh water sediments. *J. Environ. Qual.* 9: 101.
- Pillay, A.R. y Y.T. Tchan (1971). Phytotoxicity of diuron in some Australian soils. *Proc. Weed. Soc. N.S.W.* 1V: 21-24.
- Ridley, S.M. (1983). Interaction of chloroplasts with inhibitors. *Plant. Physiol.* 72: 461-468.
- Sargent, D.F. y C.P.S. Taylor (1972). Light-induced inhibition of respiration in DCMU-poisoned Chlorella sp. caused by photosystem I activity. *Canad. J. Bot.* 50: 167-172.
- Shabir, A. y R.A. Fletcher (1980). Reduced transpiration and increased water efficiency by diuron in corn. (Zea mays). *Weed Sci.* 28: 180-185.
- Sheets, T.J. y C.I. Harris (1965). Herbicides in soils and their phytotoxicities to crops grown in rotation. *Residue Rev.* 11: 119-140.
- Smith, L.W. y D.E. Bayer (1967). Soil adsorption of diuron as influenced by surfactants. *Soil. Sci.* --

103: 328-330.

- Sutton, W.F.; A.E. Brown y B. Truelove (1984). Atrazine and diuron resistant strains of Rhodospseudomonas sphaeroides. Weed Sci. 32: 664-669.
- Suzuki, T. y J.E. Casida (1981). Metabolites of diuron, linuron and methazole formed by liver microsomal enzymes and spinach plants. J. Agric. Food Chem. 29: 1027-1033.
- Tillmanns, G.M.; P.R. Wallnofer; G. Engelhardt; K. Olie y O. Hutzinger (1978). Oxidative dealkylation of five phenylurea herbicides by the fungus Cunninghamella echinulata. Thaxter. Chemosphere. 1: 59.
- Toth, J. y P.J. Milham (1973). Burning reduces herbicide effect. Agr. Gaz. N.S.W. 84: 62.
- Vaishampayan, A. (1983). Growth of Nostoc muscorum mutants in the presence of diuron (DCMU) and L-methionine-DL-sulfoximine. Experientia. 41: 137-139.
- Valencia, R.; S. Abrahamson; W.R. Lee; E.S. Von Halle; R. C. Woodruff; F.E. Würgler y S. Zimmering (1984). Chromosome mutation test for mutagenesis in Drosophila melanogaster. A report of the U.S. Environmental Protection Agency Gene-Tox Program. - Mutat. Res. 134: 61-88.
- Vogel, E. y F.H. Sobels (1976). The function of Drosophila in genetic toxicology testing. En: Chemical mutagens. Principles and methods for their detection. Hollander A. ED. Vol. 4 Plenum Press. Nueva York. p p. 93- 142.
- Ware, G.W. (1978). The pesticide book. Freeman and Com-

- pany. U.S.A. 276 p p.
- Watson, J.D. (1978). Biología molecular del gen. 3a. Edición Fondo Educativo Interamericano. México.
- Woodruff, R.C.; J.M. Mason; R. Valencia y S.Zimmering - (1985). Chemical mutagenesis testing in Drosophila. Results of 53 coded compounds tested for the national toxicology program. Environ. Mutag. 7: 667-702.
- Zimmering, S. (1976). Selected methodologies for mutagenicity testing in Drosophila melanogaster. Brown University. p p. 26.
- Zimmering, S. (1987). Aneuploidy in Drosophila. Aneuploidy I: Incidence and Etiology. Division of Biology and Medicine, Brown University. (En prensa).

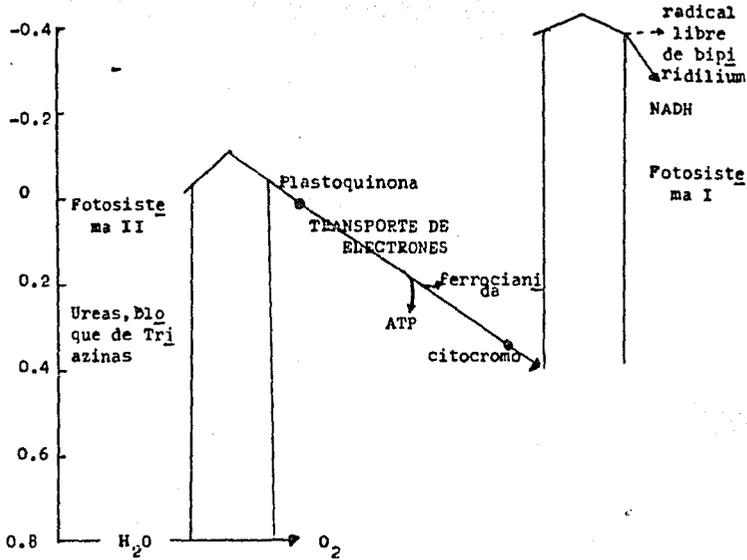


Figura 2. Mecanismo de acción del diuron en la reacción de Hill (Brown, 1978).

El diuron inhibe el fotosistema II en el cloroplasto, ya que provoca que los electrones viajen hacia las moléculas de agua, y por lo tanto, se liberan iones de H^+ y de O_2 y por lo tanto no se sintetiza ATP, ni NADH.

TABLA 1. Características de los diferentes sistemas de prueba.

Sistema de Prueba	Tiempo de duración	Costo	Mutaciones	Aberraciones cromosómicas
Microorganismos con activación metabólica:				
<u>Salmonella typhimurium</u>	2 a 3 días	Muy bajo	Excelente	
<u>Escherichia coli</u>	2 a 3 días	Muy bajo	Excelente	
<u>Neurospora crassa</u>	1 a 3 semanas	Moderado	Muy bien	Bueno
Cultivo de células de mamífero con activación metabólica	2 a 5 semanas	Moderado-alto	Excelente	Desconocido
Mediante un hospedero prueba con:				
Microorganismos	2 a 7 días	Bajo-Moderado	Bueno	
Células de Mamífero	2 a 5 semanas	Moderado-alto	Desconocido	Bueno
Análisis de líquido corporal	Variable	Variable	Variable	
Plantas:				
<u>Vicia faba</u>	3 a 8 días	Bajo		Relevancia no clara
<u>Tradescantia paludosa</u>	2 a 5 semanas	Bajo-moderado	Potencialmente Excelente	
Insectos:				
<u>Drosophila melanogaster</u> :				
Mutaciones	2 a 7 semanas	Moderado	Bueno a excelente	
Aberraciones cromosómicas	2 a 7 semanas	Moderado		Bueno a excelente
Mamíferos:				
Mutaciones dominantes letales	2 a 4 meses	Moderado-alto		Desconocidas
Translocaciones	5 a 7 meses	Moderado-alto		Potencialmente muy bueno
Mutaciones de locus específico:	2 a 3 meses	Alto-Muy alto	Desconocido	

(Tomado de Environ. Mut. Soc. 1975).

TABLA 2. Tipos de daños que se pueden detectar con los sistemas de prueba.

Sistemas		Tipo de daño detectado						
		Aberraciones cromosómicas				Mutaciones		
Categoría	ORGANISMO	Letal- mente domi- nante	Trans- locaciones	Delec- ciones Duplicaciones	No dis- yunción	Rever- sible o no o ambas	Locus Multi- ple especifico	Recombi- nación Inducida
Bacterias	<u>Salmonella typhimurium</u>					+		
	<u>Escherichia coli</u>					+		
Hongos	<u>Neurospora crassa</u>			+	+	+	+	
	<u>Aspergillus nidulans</u>				+	+	+	+
Plantas	<u>Vicia faba</u>		+	+	+			
	<u>Tradescantia paludosa</u>		+	+	+	+		
Insectos	<u>Drosophila melanogaster</u>	+	+	+	+	+	+	+
	<u>Habrobracon iwalandis</u>	+	+			+	+	+
	<u>Bombyx mori</u>	+				+	+	
Cultivo de tejidos de mamíferos	Hamster chino		+	+	+	+		
	Linfoma de ratón		+	+	+	+		
Mamíferos intactos	Ratón	+	+	+	+		+	
	Rata	+	+	+	+			
	Humano		+	+	+			

(Tomado de Environ. Mut. Soc. 1975).

TABLA 3. Número y porcentaje de letales obtenidos en la camada A (de 0 a 2 días), al tratar machos adultos silvestres, con diuron.

CAMADA	Concentración	# ♂♂	#♀♀ ₁	#♀♀ Fértiles	# letales	%letales
A	Testigo	193	2007	1662	1	0.06
	10 ppm	193	1752	1251	3	0.24
	20 ppm	198	1784	1450	2	0.14
	40 ppm	177	1572	1081	6	0.55 +

(+ Significativo al 5% en las tablas de Kastenbaum-Bowman (1970).

TABLA 4. Número y porcentaje de letales obtenidos en la camada B (de 3 a 5 Días), al tratar machos adultos silvestres, con diuron.

CAMADA	Concentración	# ♂♂	# ♀♀ F ₁	# ♀♀ Fértiles	# letales	% letales
B	Testigo	159	1620	1324	-	-
	10 ppm	189	2432	1793	3	0.17
	20 ppm	183	1994	1575	1	0.06
	40 ppm	178	2359	1738	8	0.46 +

(+ Significativo al 5% en las tablas de Kastenbaum-Bowman (1970).

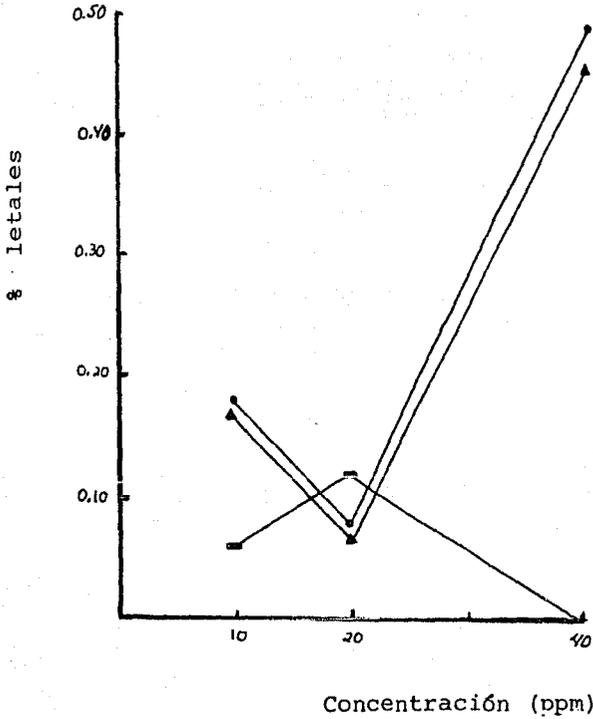
TABLA 5. Número y porcentaje de letales obtenidos en la camada C (de 6 a 7 días), al tratar machos adultos silvestres, con diuron.

CAMADA	Concentración	# ♂♂	#qqF ₁	#qqFértiles	# letales	% letales
C	Testigo	140	1690	1289	2	0.15
	10 ppm	148	2274	1932	4	0.21
	20 ppm	156	1958	1467	4	0.27
	40 ppm	154	1869	1359	2	0.15

TABLA 6. Número y porcentaje de letales obtenidos en las camadas A, B y C (0 a 7 días), al tratar machos adultos silvestres, con diuron.

CAMADA	Concentración	# ♂♂	# ♀♀ F ₁	# ♀♀ fértiles	# letales	% letales
A (0-2 días)	Testigo	193	2007	1662	1	0.06
	10 ppm	193	1752	1251	3	0.24
	20 ppm	198	1784	1450	2	0.14
	40 ppm	177	1572	1081	6	0.55 +
B (3-5 días)	Testigo	159	1620	1324	-	-
	10 ppm	189	2432	1793	3	0.17
	20 ppm	183	1934	1575	1	0.06
	40 ppm	178	2359	1738	8	0.46 +
C (6-7 días)	Testigo	140	1690	1289	2	0.15
	10 ppm	148	2274	1932	4	0.21
	20 ppm	156	1958	1467	4	0.27
	40 ppm	154	1869	1359	2	0.15

(+ Significativo al 5% en las tablas de Kastenbaum-Bowman (1970).



GRAFICA 1. Porcentaje de letales (-Testigo), inducidos por el diuron, al tratar machos progenitores de Drosophila melanogaster. (• Camada A: 0 a 2 días, ▲ Camada B: 3 a 5 días, ■ Camada C: 6 a 7 días).