



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLAN

GENOTOXICIDAD DEL INSECTICIDA CLORPIRIFOS EN CELULAS APICALES DE RAIZ DE HABA (Vicia faba L.)

70393

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
INGENIERO AGRICOLA
PRESENTA:
JOSE FERNANDO MORENO LARA

ASESOR: M.C. SANDRA DIAZ BARRIGA ARCEO
COASESOR: ING. OSCAR HORACIO GUILLEN AYALA



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 esta 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.



FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLAN
 UNIDAD DE LA ADMINISTRACION ESCOLAR
 DEPARTAMENTO DE EXAMENES PROFESIONALES

ASUNTO: VOTOS APROBATORIOS

FACULTAD DE ESTUDIOS
 SUPERIORES CUAUTITLAN



DEPARTAMENTO DE
 EXAMENES PROFESIONALES

DR. JUAN ANTONIO MONTARAZ CRESPO
 DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLAN
 PRESENTE

ATN: Q. Ma. del Carmen García Múñeres
 Jefe del Departamento de Exámenes
 Profesionales de la FES Cuautitlán

Con base en el art. 28 del Reglamento General de Exámenes, nos permitimos comunicarle a usted que revisamos la TESIS.

"Genotoxicidad del insecticida clorpirifos en células
 apicales de raíz de haba (Vicia faba L.)"

que presenta el pasante: José Fernando Moreno Lara
 con número de cuenta: 9004248-7 para obtener el título de
 Ingeniero Agrícola

Considerando que dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para ser discutido en el EXAMEN PROFESIONAL correspondiente, otorgamos nuestro VOTO APROBATORIO

ATENTAMENTE

"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"

Cuautitlán Izcalli, Méx. a 6 de Julio de 2001

PRESIDENTE M.C. Sandra Díaz Barriga Arceo *Sandra Díaz Barriga Arceo*

VOCAL Ing. Hilda Carina Gomez Villar *Hilda Carina Gomez Villar*

SECRETARIO Biol. Elva Martínez Holguín *Elva Martínez Holguín*

PRIMER SUPLENTE Q.F.B. Rosalba Bonilla Sánchez *Rosalba Bonilla Sánchez*

SEGUNDO SUPLENTE MVZ. Carmen Barron Garcia *Carmen Barron Garcia*

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Nacional Autónoma de México, por permitirme tener el privilegio de formar parte de ella.

A la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán y a la carrera de Ingeniería Agrícola que hicieron posible mi formación profesional.

A los integrantes del jurado, por sus opiniones y sugerencias para mejorar la redacción y el contenido del presente trabajo:

M.C. Sandra Díaz Barriga Arceo.

Ing. Hilda Carina Gómez Villar.

Biol. Elva Martínez Holguín.

Q.F.B. Rosalba Bonilla Sánchez.

MVZ. Carmen Barrón García.

A todos los profesores de la carrera de Ingeniería Agrícola, por haberme formado como profesional y humano. Y en especial a la Q. Celia Valencia Islas, Ing. José Luis Garduño Valdés e Ing. Roberto Guerrero Agama.

Al Ing. Oscar Horacio Guillén Ayala, por su valiosa amistad y por el apoyo brindado para la realización de este trabajo. Quien siempre ha estado conmigo en las buenas y en las malas y que me ha otorgado su apoyo incondicional, además de orientado y estimulado para seguir adelante.

A mis compañeros de la 18ª. Generación de la carrera de Ingeniería Agrícola por su amistad, compañerismo y apoyo durante nuestra formación profesional.

A mis amigos: Jorge, José Luis, Miguel, Enrique, Juevenal, Josue, Juan, Félix, Norma, Marina, Elizabeth y José, por brindarme su amistad incondicional que nunca olvidare.

DEDICATORIAS

A mi madre Socorro Lara Olmos. Por su comprensión, amor y confianza en mí para continuar superándome en el difícil camino de la vida.

A mis hermanos: Leticia y Sergio por su comprensión y cariño.

A mis sobrinos: Noé y José Luis, por el gran amor que les tengo.

A mis mascotas: Bobby I (+), Bobby II y Rufo por darme alegría y cariño todos los días.

“La guerra contra el hambre es la verdadera guerra de liberación de la humanidad. No hay batalla más importante en la tierra o en el espacio, ya que la paz y el progreso no pueden ser mantenidos en un mundo medio alimentado y medio hambriento”.

John F. Kennedy



“La historia de la tierra está escrita en la corteza, como la historia de los seres vivos lo está en sus cromosomas”.

H. Kihara

“De todos los oficios lucrativos, ninguno mejor, ni más productivo, ni más agradable, ni más digno del hombre libre que la agricultura”.

Ciceron

INDICE.

Página

Indice de cuadros	I
Indice de figuras	II
Resumen	III
1.-Introducción.	1
Objetivos.	5
Hipótesis.	5
2.-Revisión de literatura.	6
2.1.-Generalidades de los insecticidas.	6
2.2.- Generalidades del insecticida clorpirifós.	8
2.3.-Efecto tóxico del clorpirifós en las plantas.	23
2.3.1.- Intervalo de seguridad en las aplicaciones del clorpirifós.	23
2.3.2.- Efecto tóxico del clorpirifós en las plantas.	24
2.3.3.- Residualidad del insecticida clorpirifós.	27
2.4.- Ciclo celular y mitosis en células meristemáticas.	31
2.4.1.- Ciclo celular.	31
2.4.2.- Mitosis.	34
2.5.-Importancia de la evaluación genotóxica.	41
2.6.-Definición y antecedentes de la prueba de Micronúcleos (MN).	43
2.7.-Importancia del estudio de la prueba de MN.	49
2.8.- El haba (<i>Vicia faba</i> L.) como material biológico.	57
3.-Materiales y métodos.	60
3.1.-Material biológico.	60
3.2.-Materiales y reactivos.	60
3.3.-Metodología.	61
3.4.- Análisis citogenético.	63
3.5.- Criterios para seleccionar células micronucleadas.	63
3.6.- Análisis estadístico.	64
4.- Resultados.	65
5.- Discusión de resultados.	72
6.- Conclusiones.	77
7.- Recomendaciones y sugerencias para trabajos futuros.	78
8.- Bibliografía.	79
9.- Apéndice.	87

INDICE DE CUADROS

	Página
Cuadro 1. Cultivos agrícolas en los que se aplica el insecticida clorpirifós en México.	11 y 12
Cuadro 2. Plagas en las que se utiliza el insecticida clorpirifós en México.	13 y 14
Cuadro 3. Nombres comerciales del insecticida clorpirifós para uso urbano en México.	15
Cuadro 4. Nombres comerciales del insecticida clorpirifós para uso industrial en México.	16
Cuadro 5. Nombres comerciales del insecticida clorpirifós para uso doméstico en México.	16
Cuadro 6. Nombres comerciales del insecticida clorpirifós para uso pecuario en México.	16
Cuadro 7. Nombres comerciales del insecticida clorpirifós para uso agrícola en México.	18 y 19
Cuadro 8. Criterios recomendados para la aplicación en algunos cultivos del insecticida clorpirifós concentrado emulsionable.	21
Cuadro 9. fitotoxicidad reportada en algunas plantas causada por el insecticida clorpirifós.	25
Cuadro 10. Tolerancia establecidas por la Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos (EPA, 2000) para diversos productos agropecuarios.	30
Cuadro 11. Frecuencia de micronúcleos.	65
Cuadro 12. Frecuencia del Índice Mitótico.	70
Cuadro 13. Análisis de varianza para la frecuencia de micronúcleos (MN).	71
Cuadro 14. Análisis de varianza para la frecuencia del Índice Mitótico (IM).	71
Cuadro A. Prueba de Tukey-Kramer para la frecuencia de micronúcleos.	87
Cuadro B. Prueba de Tukey-Kramer para la frecuencia del Índice Mitótico (IM).	87

INDICE DE FIGURAS

Página

Figura 1. Fórmula química del insecticida clorpirifós.	9
Figura 2. Síntesis química del insecticida clorpirifós.	9
Figura 3. Ciclo celular.	32
Figura 4. Ciclo celular en Haba (<i>Vicia faba</i> L.).	34
Figura 5. Fases de la mitosis en células meristemáticas vegetales.	35
Figura 6. Promedios de la frecuencia de MN.	66
Figura 7. Promedios de la frecuencia del Índice Mitótico.	66
Figura 8. Célula con micronúcleos (1).	67
Figura 9. Célula con micronúcleos (2).	67
Figura 10. Célula de <i>Vicia faba</i> L. en profase.	68
Figura 11. Célula de <i>Vicia faba</i> L. en metafase.	68
Figura 12. Célula de <i>Vicia faba</i> L. en anafase.	69
Figura 13. Célula de <i>Vicia faba</i> L. en telofase.	69

RESUMEN

El uso inadecuado de los insecticidas ha creado un serio deterioro ambiental, contaminando elementos tales como agua, suelo, aire y como consecuencia afectando a los seres vivos, alterando con esto el equilibrio ecológico. Una de las consecuencias del abuso en la utilización de estos productos es que pueden provocar la generación de sustancias genotóxicas en los organismos vegetales en los que se aplica. El grupo de los insecticidas organofosforados han demostrado tener este efecto en diversos organismos tanto *in vivo* como *in vitro*. Por lo anterior, se escogió un insecticida de contacto perteneciente a este grupo, denominado clorpirifós 0,0-dietil-0-(3,5,6-tricloro-2-piridinil)fosfotioato, agroquímico que ha presentado fitotoxicidad en algunas plantas de importancia económica, tales como algunas ornamentales, cítricos, cucurbitáceas, etc.

Para determinar si este producto tiene efectos genotóxicos se planteó en el presente estudio evaluar la frecuencia de micronúcleos (MN) e índice mitótico (IM) en células del meristemo apical de raíz de haba (*Vicia faba* L.), después de la exposición de éstas al insecticida clorpirifós.

La prueba seleccionada para observar el daño citogenético de este insecticida fue la de micronúcleos (MN), que se encuentra entre los estudios que detectan alteraciones a nivel de cromosoma, y que es una prueba sencilla, confiable y de alta sensibilidad, para determinar el efecto genotóxico de una sustancia química en el ambiente, utilizando como bioindicador de esta actividad células meristemáticas de raíz de haba (*Vicia faba* L.). Para medir el daño genotóxico de este producto se determinó la frecuencia de micronúcleos (MN) e índice mitótico (IM) en células meristemáticas de raíz de haba, después de haber sido expuestas a diferentes concentraciones de 0.5, 2.0, 3.0, 4.0 y 5.0 ppm de ingrediente activo y contándose además con un testigo.

Los resultados encontrados indican que el insecticida clorpirifós incrementa significativamente la frecuencia de micronúcleos en las concentraciones estudiadas en comparación con el testigo, observándose que la dosis de 2.0 ppm fue la que manifestó el mayor número de micronúcleos. Con respecto al índice mitótico, este agroquímico también lo modifica, ya que se nota una disminución de este en la mayoría de las dosis (a excepción de la concentración de 5.0 ppm) con respecto al testigo.

1.-INTRODUCCION.

Desde los inicios de la civilización el ser humano ha tratado de luchar continuamente para mejorar sus condiciones de vida y una parte fundamental de ésta ha sido la de producir las provisiones necesarias de alimentos; pero para lograr lo anterior ha tenido que combatir los estragos ocasionados por diversos factores, entre ellos plagas de insectos y enfermedades que atacan a las plantas cultivadas.

Una opción que se ha creado para la lucha, control y protección contra estos organismos patógenos es el combate químico, utilizando para ello un sinfín de productos agroquímicos como son los insecticidas. Según Metcalf (1990), en algunas ocasiones éstos son el único instrumento confiable para acciones de emergencia cuando las poblaciones de la plaga se aproximan o rebasan el umbral económico.

Entre las ventajas que ha tenido el uso de estos productos es el incremento en la productividad de los cultivos, al eliminar a los organismos que compiten y merman las cosechas de las plantas cultivadas. Pero el uso inadecuado de los insecticidas también ha creado algunas desventajas como son la contaminación ambiental y por consecuencia el acarreo de serias enfermedades como el cáncer, la generación de residuos, alteraciones genéticas e incluso la muerte en trabajadores agrícolas expuestos a dosis crónicas por estos agroquímicos (Kong y Ma, 1999).

Entre los primeros insecticidas orgánicos sintéticos ampliamente usados por el hombre se encuentran los pertenecientes al grupo de los organoclorados, cuyo uso se extendió desde los años cincuenta con la aparición del diclorodifeniltricloroetano (D.D.T.) hasta la fecha; pero este grupo de insecticidas presentan la desventaja de tener efectos duraderos en agua y suelo en periodos de hasta 10 años debido a su baja solubilidad en el agua y a su alta lipofilicidad; se concentran en los componentes vivientes de algunos ecosistemas como lo es el de los lagos; por lo que tienden a acumularse en el ambiente y pasan a recircular a través de las cadenas alimentarias (Cremllyn, 1995; Carrero, 1996).

Los insecticidas organofosforados son la opción más viable, junto con los piretroides, de sustituir a los plaguicidas organoclorados, por su acción menos persistente, ya que teóricamente se degradan rápidamente en materiales menos tóxicos después de su aplicación y, en consecuencia, no tienen efectos duraderos (Carrero, 1996). Pero estudios de diversos autores han demostrado que este grupo de insecticidas pueden producir efectos genotóxicos en diversos organismos tanto *in vivo* como *in vitro*, causando alteraciones citogenéticas como en trabajadores agrícolas expuestos a dosis crónicas y en vegetales como cebolla (*Allium cepa* L.), haba (*Vicia faba* L.) y tradescantia (*Tradescantia spp*) (Kong y Ma, 1999). Por lo anterior, se escogió un insecticida orgánico de contacto perteneciente al grupo de los organofosforados, denominado clorpirifós 0,0-dietil-0-(3,5,6-tricloro-2-piridinil) fosforotioato, creado en 1965 por la empresa Dow Chemical Company, y una de cuyas características es tener un amplio espectro de uso. Este es un producto importado, y en

México se encuentra en las presentaciones comerciales de concentrado emulsionable, polvo humectable, polvo para espolvorear y pellet. Este es un producto de materia activa politóxica, es decir, menos selectivo (Cremllyn, 1995; Carrero, 1996).

Entre los usos que puede tener este insecticida, están el doméstico, para el control de plagas, como lo es la mosca común; el industrial para el control de plagas de almacén y pecuario, como garrapaticida en ganado vacuno y ovino (Cremllyn, 1995).

El principal uso es el agrícola, ya que se recomienda para el tratamiento en el suelo contra un complejo de gusanos, también para el tratamiento de semillas de maíz, arroz y hortalizas, así como en viveros en pre y post-emergencia, en árboles frutales caducifolios como el manzano y en árboles tropicales como la papaya; en hortalizas, plantas ornamentales, granos básicos e incluso praderas deportivas (DelCañizo et al, 1990; Thomson, 1992 y Rosenstein, 1994).

Este insecticida es un producto de ingrediente activo politóxico y por su gran cobertura de uso, se ha observado que presenta fitotoxicidad en algunas plantas ornamentales como son: azalea, camelia, petunia, rosal, hiedra, anturio y algunos helechos, cuyo daño se refleja en el follaje y flor de estas plantas (Hata y Hara, 1988; Simental, 1990 y Thomson, 1992). El daño se observa en plantas cultivadas como la alfalfa, principalmente en el follaje, por el cual afecta la calidad del forraje (Ministerio de Agricultura de España, 1994). En cítricos, causa alteraciones en la cáscara de los frutos, reflejándose en cicatrices y abultamientos en los mismos frutos, por lo que se traduce en la disminución de su calidad y daño en la corteza de los árboles adultos (Beck et al, 1991 y Grout, 1992).

El daño de fitotoxicidad, también se puede presentar en vid, olivo y cucurbitáceas en general, disminuyendo con esto la calidad de los frutos y por consiguiente generando pérdidas económicas (Simental, 1990 y Thomson, 1992). En México, ocasiona daños pero no están cuantificados, es decir, se sabe que ocasiona problemas en los cultivos pero no hay estadísticas al respecto.

Los daños también se presentan e incluso se potencializan cuando se combina este plaguicida con otros insecticidas como la cypermetrina, usado ampliamente en el cultivo del lino, cuyo daño se observa en la aparición de la panoja, dañando con esto la calidad de las fibras para el que se destina este producto (Αντονα, 1990). También la combinación con algunos herbicidas como el cycloato causa un daño que se ha observado principalmente en remolacha azucarera (Wilson y Hein, 1991).

Se puede prevenir el daño que ocasiona el producto mediante la realización de estudios genotóxicos que permiten hacer una evaluación temprana de un agroquímico que puede causar una toxicidad a nivel genético en la planta, manifestación que se detecta antes de que se presente a nivel fisiológico y morfológico en el vegetal ya establecido y con el consiguiente gasto económico. Entre los estudios para identificar el potencial genotóxico de esta sustancia se han realizado diversas investigaciones en bacterias, cultivos celulares de roedores y de células humanas, estas últimas en trabajadores agrícolas expuestos a este insecticida, pero dada la escasez de este tipo de estudios en células vegetales, se propuso realizar este trabajo.

La prueba seleccionada para el presente trabajo y que se utilizó para observar el daño citogenético de este insecticida fué la de micronúcleos (MN), que se encuentra entre los estudios que detectan alteraciones a nivel de cromosoma, y que es considerada una prueba sencilla, confiable y de alta sensibilidad, para determinar el efecto genotóxico de una sustancia química en agua, suelo y aire, utilizando como bioindicador a las plantas.

Un sistema de prueba vegetal muy útil para la detección de la actividad genotóxica de los agroquímicos lo constituyen las células meristemáticas de la raíz de haba (*Vicia faba L.*), que ofrecen un amplio espectro de posibilidades de análisis citogenéticos.

OBJETIVOS.

- Determinar la frecuencia de micronúcleos (MN) en células del meristemo apical de la raíz de haba (*Vicia faba L.*), después de haber sido expuestas a diferentes concentraciones del insecticida clorpirifós.
- Evaluar la proliferación celular de las células meristemáticas de haba (*Vicia faba L.*) después de la exposición de éstas al insecticida clorpirifós.

HIPOTESIS.

Si el insecticida clorpirifós actúa como agente genotóxico directo induciendo alteraciones cromosómicas en las células apicales de raíz de haba (*Vicia faba L.*), se observará un aumento en la frecuencia de micronúcleos (MN).

2.-REVISION DE LITERATURA.

2.1.-Generalidades de los insecticidas.

Los insecticidas se clasifican según la forma en que se relacionan con el problema fitosanitario para ejercer su modo de acción en:

- 1.- De contacto.
- 2.- Por inhalación.
- 3.- De ingestión.
- 4.- Sistémicos (Segura, 1990).

Los plaguicidas de contacto o de superficie no penetran notablemente en los tejidos del sistema vascular de la planta. Pero pueden presentar la desventaja de que a veces no resisten las inclemencias del clima (viento, lluvia y sol) durante mucho tiempo y que al crecer la planta, las partes nuevas están desprotegidas y, por lo tanto, expuestas al ataque de insectos y hongos (Segura, 1990).

La producción de insecticidas de uso agrícola a gran escala apenas data de fines de la segunda guerra mundial y de la introducción en el mercado de los herbicidas selectivos derivados del ácido fenoxiacético y de los insecticidas sintéticos organoclorados y organofosforados (Cremllyn, 1995).

Según Simental (1990), los insecticidas organofosforados se dividen en:

- Derivados alifáticos.
- Fenil derivados.
- Derivados heterocíclicos (dentro de este grupo se ubica el insecticida clorpirifós).

Una ventaja teórica que presentan los insecticidas organofosforados según Hassall (1990), Lagunes y Villanueva (1994) y Cremlyn (1995), es que éstos se degradan rápidamente en materiales menos tóxicos y usualmente son degradados en el suelo en un periodo de tiempo de hasta 3 meses, por lo que no tendrían efectos tan duraderos como sucede con los insecticidas organoclorados, de tal forma que los organofosforados, según estos autores no tienden a acumularse en el ambiente y por lo tanto, no pasan a las cadenas alimentarias. Estudios realizados por Papale (2000), indican que efectivamente los insecticidas organofosforados pueden ser de bajo poder residual pero con una elevada toxicidad, ya que esta autora ha encontrado residuos en suelos agrícolas después de 2 años de haberse aplicado insecticidas organofosforados.

Autores como Kong y Ma (1999) y Mohammed y Ma (1999), en estudios recientes han encontrado que los agroquímicos pertenecientes al grupo de los organofosforados son capaces de causar un efecto genotóxico induciendo alteraciones citogenéticas en los vegetales y otros organismos, por ejemplo en trabajadores agrícolas expuestos a dosis agudas en plantaciones de algodón en los Estados Unidos con productos como el diazinon, el dimetoato, paratión metílico y fosmet, encontraron que en las células de linfocitos periféricos en la sangre de estos trabajadores se producían efectos clastogénicos reflejados en aberraciones cromosómicas, intercambios y poliploidia. Igualmente, el insecticida dimetoato en dosis de 1mM puede inducir mutaciones y conversiones genéticas en la bacteria *Saccharomyces cerevisiae*; este mismo producto en plantas de tradescantia (clon 4430) incrementa las mutaciones y reduce el número de estambres por filamento en las flores de este vegetal conforme se

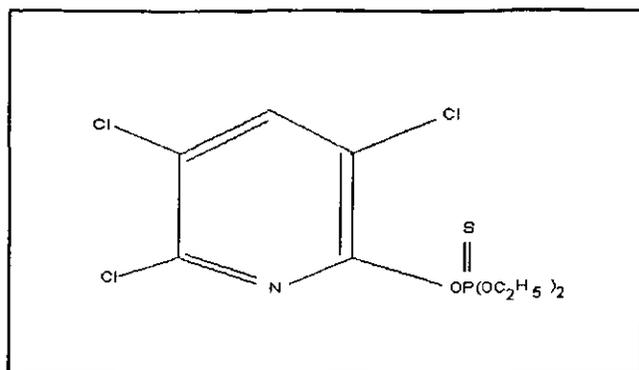
aumenta la dosis de este producto. En haba (*Vicia faba* L.), estos mismos autores han encontrado que aplicando diazinon, dimetoato, paratión metílico, fosmet y monocrotofos, se pueden observar efectos clastogénicos reflejados en aberraciones cromosómicas induciendo células en forma de bastón, células poliploides y alargamientos cromosómicos.

La mayoría de los organofosforados actúan como insecticidas de contacto, fumigantes y de acción estomática, pero también se encuentran materiales sistémicos, que cuando se aplican al suelo y a las plantas son absorbidos por hojas, tallos, corteza y raíces, que circulan en la savia haciéndola tóxica para los insectos que se alimentan al succionarla (Lagunes y Villanueva, 1994).

2.2.-Generalidades del insecticida clorpirifós.

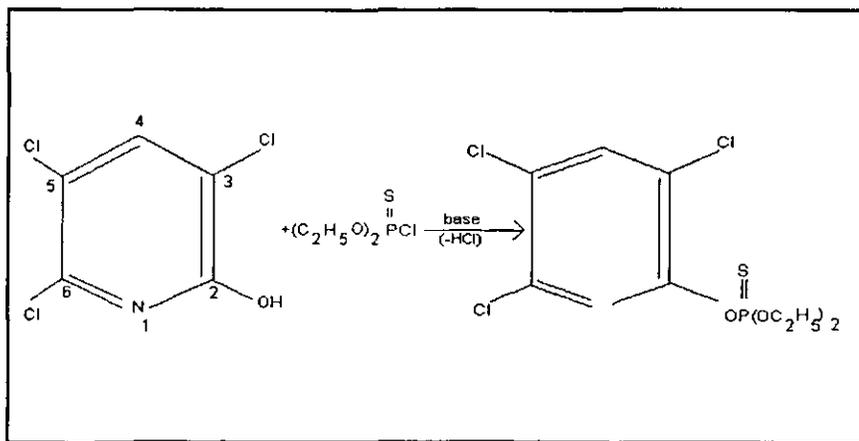
El clorpirifós 0,0-dietil-0-(3,5,6-tricloro-2-piridinil) fosforotioato y cuya fórmula química es : $C_9H_{11}Cl_3NO_3PS$ (figura 1), fue formulado por primera vez en 1965 por la empresa química The Dow Chemical Company; y se prepara por medio de la reacción del clorofósforo tioato de 0,0-dimetilo con 3,5,6-tricloro-2-hidroxipiridina (figura 2). El material puro está en forma de cristales sólidos blancos con un ligero olor al fungicida Mercaptan (azufre); el líquido es de color rojo y el clorpirifós técnico de color ámbar (TCYE, 2000). Este insecticida, dadas sus propiedades físicas, es muy insoluble en el agua, es decir, que presenta una baja solubilidad en agua (2mg/l a 25°C), es mayormente soluble en solventes orgánicos (Extensión científica, 1996).

FIGURA 1. FORMULA QUIMICA DEL INSECTICIDA CLORPIRIFOS.



Fuente: Cremlyn, R; 1995

FIGURA 2. SINTESIS QUIMICA DEL INSECTICIDA CLORPIRIFOS.



Fuente: Cremlyn, R; 1995

Actualmente es comercializado por la empresa Dow Elanco (Simental, 1990; Thomson, 1992 y Cremlyn, 1995).

El clorpirifós es un insecticida y acaricida orgánico no sistémico, con actividad de amplio espectro, perteneciente al grupo de los organofosforados que tiene acción de contacto, translaminar (lo cual reduce el riesgo de lavado por lluvia), ingestión e inhalación, y cuyos transportadores usuales son las arcillas sintéticas, el talco y diversos solventes (Simental, 1990; Thomson, 1992; Cremlyn, 1995 y FMC, 1999).

Este producto en México, se utiliza en muchos cultivos agrícolas (cuadro 1). Asimismo este insecticida puede combatir una gran variedad de plagas de importancia económica en diversos cultivos de nuestro país (cuadro 2).

Este producto, según la Comisión Intersecretarial para el Control del Proceso y Uso de Plaguicidas, Fertilizantes y Sustancias Tóxicas (CICOPLAFEST, 1995 y 1998) está formulado para tener una gran gama de usos; como lo es agrícola, pecuario, doméstico, urbano e industrial.

Para el control de plagas caseras e industriales como son: hormigas, termitas, cucarachas, mosca común, y mosquitos (en estado larvario y adulto) dicho producto puede tener varios nombres comerciales (cuadros 3, 4 y 5). Pero en algunas especies de larvas de mosquitos (*Culex pipiens*) y mosca común (*Anopheles albimanus*) se ha creado resistencia múltiple a este insecticida y en general a todos los plaguicidas organofosforados (Hassall, 1990; Metcalf, 1990 y Roush, 1990).

CUADRO 1. CULTIVOS AGRICOLAS EN LOS QUE SE APLICA EL CLORPIRIFOS EN MEXICO.

CULTIVO	NOMBRE CIENTIFICO	PRESENTACION INSECTICIDA APLICABLE
Alfalfa	<i>Medicago sativa</i> L.	Concentrado emulsionable, polvo y polvo humectable aplicado al follaje.
Algodón	<i>Gossypium hirsutum</i> L.	Concentrado emulsionable, polvo y polvo humectable aplicado al follaje.
Arroz	<i>Oryza sativa</i> L.	Concentrado emulsionable, polvo y polvo humectable aplicado al follaje.
Avena	<i>Avena sativa</i> L.	Concentrado emulsionable, polvo y polvo humectable aplicado al follaje.
Caña de azúcar	<i>Saccharum officinarum</i> L.	Concentrado emulsionable, polvo y polvo humectable aplicado al follaje.
Citricos	<i>Citrus spp.</i>	Concentrado emulsionable, polvo y polvo humectable aplicado al follaje.
Chile	<i>Capsicum spp.</i>	Concentrado emulsionable, polvo y polvo humectable aplicado al follaje.
Frijol ejotero	<i>Phaseolus vulgaris</i> L.	Concentrado emulsionable, polvo y polvo humectable aplicado al follaje.
Jitomate	<i>Lycopersicum esculentum</i> L.	Concentrado emulsionable, polvo y polvo humectable aplicado al follaje.
Maíz	<i>Zea mays</i> L.	Concentrado emulsionable, polvo y polvo humectable aplicado al follaje y aplicado al suelo en forma granulada.
Manzano	<i>Malus spp.</i>	Concentrado emulsionable, polvo y polvo humectable aplicado al follaje.
Pepino	<i>Cucumis sativum</i> L.	Concentrado emulsionable, polvo y polvo humectable aplicado al follaje.
Plátano	<i>Musa paradisiaca</i> L. y <i>Musa sapientum</i> L.	Concentrado emulsionable, polvo y polvo humectable aplicado al follaje y en forma de pellet por impregnación de bolsas de polietileno.
Potreros	Fam <i>Gramineae</i> y <i>leguminosae.</i>	Concentrado emulsionable, polvo y polvo humectable aplicado al follaje.

Continúa.....

Sorgo	<i>Sorghum vulgare</i> Pers.	Concentrado emulsionable, polvo y polvo humectable aplicado al follaje.
Zarzamora	<i>Rubus spp.</i>	Concentrado emulsionable, polvo y polvo humectable aplicado al follaje.
Soya	<i>Glycine max.</i> L.	Concentrado emulsionable, polvo y polvo humectable aplicado al follaje.
Trigo	<i>Triticum aestivum</i> L.	Concentrado emulsionable, polvo y polvo humectable aplicado al follaje.
Vid	<i>Vitis vinifera</i> L.	Concentrado emulsionable, polvo y polvo humectable aplicado al follaje.
Zanahoria	<i>Daucus carota</i> L.	Concentrado emulsionable, polvo y polvo humectable aplicado al follaje.
Fuente: Comisión intersecretarial para el control del proceso y uso de plaguicidas, fertilizantes y sustancias tóxicas (CICOPLAFEST), 1995 Y 1998.		

CUADRO 2. PLAGAS EN LAS QUE SE UTILIZA EL INSECTICIDA CLORPIRIFOS EN MEXICO.

CULTIVOS	PLAGAS
Sorgo	- Chinche café del sorgo (<i>Deblaus mexicanus</i>). - Mosquita midge (<i>Contarinia sorhicola</i>). - Gusano del fruto (<i>Heliothis zea</i>). - Gusano cogollero (<i>Spodoptera frugiperda</i>). - Minador de la hoja (<i>Liriomyza munda</i>). - Gusano soldado (<i>Mythimna unipuncta</i>).
Maíz	- Gusano cogollero (<i>Spodoptera frugiperda</i>). - Gusano soldado (<i>Mythimna spp.</i>).
Trigo	- Pulgón de la espiga (<i>Macrosiphum spp.</i>). - Gusano soldado (<i>Pseudaletia spp.</i>).
Jitomate	- Minador de la hoja (<i>Liriomyza munda</i>). - Gusano del fruto (<i>Heliothis spp.</i>). - Gusano peludo (<i>Estigmene acrea</i>). - Gusano alfiler (<i>Keiferia lycopersicella</i>). - Gusano trozador (<i>Spodoptera exigua</i>).
Chile o pimiento	- Barrenillo (<i>Anthonomus eugeni</i>). - Gusano soldado (<i>Prodenia spp.</i>).
Manzano	- Pulgón lanigero (<i>Eriosoma lanigerum</i>). - Palomilla de la manzana (<i>Cydia pomonella</i>).
Pepino	- Minador de la hoja (<i>Liriomyza munda</i>).
Caña de azúcar	- Gusano soldado (<i>Laphygma frugiperda</i>). - Pulgones (<i>Sipha flava</i>). - Chinche de encaje (<i>Leptodyctia tabica</i>). - Chicharritas (<i>Dalbulus elimatus</i> y <i>Empoasca spp.</i>). - Falso medidor (<i>Moris latipes</i>). - Mosca pinta (<i>Aereolamia postica</i>). - En post-emergencia.
Algodón	- Gusano bellotero (<i>Heliothis zea</i> y <i>Melipotis virescens</i>). - Gusano soldado (<i>Spodoptera exigua</i>). - Gusano perforador de la hoja (<i>Bucculatrix thurberiella</i>). - Chinche lygus (<i>Lygus spp.</i>). - Gusano trozador (<i>Pectinophora gossypiella</i>). - Pulgones (<i>Aphis gossypii</i>). - Araña roja (<i>Tetranychus spp.</i>). - Trips (<i>Frankliniella spp.</i> ; <i>Thrips tabaci</i> y <i>Hercotrips spp.</i>).

Continúa.....

Arroz	<ul style="list-style-type: none"> - Gusano soldado (<i>Spodoptera exigua</i>). - Falsas chicharritas (<i>Sogota cubana</i>, <i>S. funcifera</i> y <i>S. orizicola</i>). - Sanjigueta del arroz (<i>Chironomus tepperi</i> Skuse).
Alfalfa	<ul style="list-style-type: none"> - Pulgón verde (<i>Acyrtosiphon pisum</i>). - Pulgón manchado (<i>Terioaphis maculata</i>). - Araña roja (<i>Tetranychus spp.</i>). - Trips (<i>Hercotrips spp.</i> y <i>Frankliniella spp.</i>). - Gusano soldado (<i>Spodoptera exigua</i>). - Larva del picudo egipcio (<i>Hyperia brunneipennis</i>). - Chinche ligus (<i>Lygus elisus</i>). - Gusano trozador (<i>Peridroma saucia</i>). - Chinchas (<i>Lygus spp.</i>).
Zanahoria	- En pre y post-emergencia.
Frijol ejotero	<ul style="list-style-type: none"> - Gusano soldado (<i>Laphygma frugiperda</i>). - Minador de la hoja (<i>Liriomyza spp.</i>).
Cítricos	- Ardor de los cítricos o negrilla (<i>Philocopitura olsivora</i>).
Soya	- Gusano cortador (<i>Plathypena scabra</i>).
Potreros	- Mosca pinta (<i>Aeneolamia postica</i>).
Fuente: Altamira y Hernández, 1990; Calixto, 1990; Comisión intersecretarial para el control de plaguicidas, fertilizantes y sustancias tóxicas (CICOPLAFEST), 1995 y 1998; Llanos, 1994; López, 1994; Robles, 1990 y Rosenstein, 1994.	

CUADRO 3. NOMBRES COMERCIALES DEL INSECTICIDA CLORPIRIFOS PARA USO URBANO EN MEXICO.

NOMBRE COMERCIAL	FORMULACION %	PRESENTACION
3M Chlorpyrifos livestock premise spray concentrate	20	Solución acuosa
Control 24E	27.13	Concentrado emulsionable
Dursban 2E y/o Dursban Pro	24.50	Concentrado emulsionable
Dursban 2E y/o Dursban Pro	22.47	Concentrado emulsionable
Dursban LO	42.90	Microemulsión concentrada
Dursban Tom	42.80	Concentrado emulsionable
Empire 20	20	Solución acuosa
Insecta	0.96	Pintura vinil acrílica
Insectec	41	Concentrado emulsionable
Moscoff 123 C.E./Provin 123 C.E./ Aedex 123 C.E.	13.624	Concentrado emulsionable
Mosquitocida public health uno U.L.V. / Mosquicida uno	13.624	Líquido
Pirifosdel 480	44.92	Concentrado emulsionable
Termidan y/o Lordex y/o terban tx	44.44	Concentrado emulsionable
Termidel 48	49	Concentrado emulsionable
Fuente: Comisión intersecretarial para el control del proceso y uso de plaguicidas, fertilizantes y sustancias tóxicas (CICOPLAFEST), 1995 Y 1998.		

CUADRO 4. NOMBRES COMERCIALES DEL INSECTICIDA CLORPIRIFOS PARA USO INDUSTRIAL EN MEXICO.

NOMBRE COMERCIAL	FORMULACION %	PRESENTACION
Clorpirifós técnico	94	Sólido técnico
Dursban R	99	Sólido técnico
Dursban solvesso 150 y/o Dursban aromina	70	Líquido técnico
Dursban 30 sec	30	Concentrado emulsionable
Dursban HF	62.5	Concentrado emulsionable
Dursban WT	44.4	Concentrado emulsionable
Insecta	41	Líquido técnico
Lorsban polyethylene D y/o Dursban polyethylene D	1	Pellet
Wood	1.24	Líquido

Fuente: Comisión intersecretarial para el control del proceso y uso de plaguicidas, fertilizantes y sustancias tóxicas (CICOPLAFEST), 1995 Y 1998.

CUADRO 5. NOMBRES COMERCIALES DEL INSECTICIDA CLORPIRIFOS PARA USO DOMESTICO EN MEXICO.

NOMBRE COMERCIAL	FORMULACION %	PRESENTACION
Ortho ANT Stop	1	Polvo
Ortho garden Care	5.3	Líquido
Ortho home Care	0.5	Líquido soluble
Raid 8	0.52	Trampas
Raid Max sistema exterminador 8 unidades mata cucarachas	0.5	Cebo con insecticida sólido
Raid Max sistema exterminador 4 unidades mata hormigas	0.0315	Cebo con insecticida sólido

Fuente: Comisión intersecretarial para el control del proceso y uso de plaguicidas, fertilizantes y sustancias tóxicas (CICOPLAFEST), 1995 Y 1998.

CUADRO 6. NOMBRES COMERCIALES DEL INSECTICIDA CLORPIRIFOS PARA USO PECUARIO EN MEXICO.

NOMBRE COMERCIAL	FORMULACION %	PRESENTACION
Dursban 24-E	23.76	Solución concentrada
Lepecid	2.5	Aerosol
Link	23.76	Solución concentrada

Fuente: Comisión intersecretarial para el control del proceso y uso de plaguicidas, fertilizantes y sustancias tóxicas (CICOPLAFEST), 1995 Y 1998.

Se recomienda además en el control de ectoparásitos, como las garrapatas (*Amblyomma variegatum* y *Boophilus microplus* Can.) en ganado vacuno y ovino en muchos países (cuadro 6) (Metcalf, 1990; Simental, 1990; Thomson, 1992; Cremllyn, 1995 y FMC, 1999). También se puede utilizar para el control de malezas en áreas no cultivadas (Rosenstein, 1994).

En México a este insecticida. para uso agrícola, se le encuentra en varias presentaciones y con gran cantidad de nombres comerciales (cuadro 7). El insecticida utilizado en este trabajo fué el clorpirifós con nombre comercial de Tyson 2E tridente con una concentración del 26.24% en la presentación de concentrado emulsionable.

El insecticida como polvo espolvoreable del 1.5% se puede usar a razón de 20 a 30 Kg./ha. Para el polvo humectable al 50% la dosis es de 1750 a 3500 gramos de i.a./ 100 lt. de agua. El concentrado emulsionable al 33.8%; 44.44% y al 44.5% se aplican en una dosis de 0.75 a 2.0 L. /ha.. El granulado al 2% se aplica de 8 a 12 kilogramos por hectárea y el granulado al 3% contra plagas del suelo, se puede emplear de 15 a 60 Kg./ha. antes de la siembra o bien de 8 a 15 Kg./ha localizado en las líneas de siembra, colocándolo en el surco al sembrar o trasplantar, enterrándolo a continuación. Hay otro granulado del 1.5% de ingrediente activo, de gránulos más finos, que puede usarse contra plagas del suelo empleando de 135 a 200 Kg./ha., pero que en realidad está preparado especialmente para combatir plagas del maíz (*Zea mays* L.) y el sorgo (*Sorghum vulgare* Pers), aplicándolo cuando se observa el 50% de las panículas o espigas masculinas dañadas y procurando que los gránulos no caigan al suelo, sino por

CUADRO 7. NOMBRES COMERCIALES DEL INSECTICIDA CLORPIRIFÓS PARA USO AGRICOLA EN MEXICO.

NOMBRE COMERCIAL	FORMULACION %	PRESENTACION
Anaclor 480	44.5	Concentrado Emulsionable
Attamix SB	0.120	Cebo envenenado
Bolsas Lorsban polyethylene D 1%	1	Bolsas
Clorpirifós 94% Tec.	94	Polvo técnico
Clorpirifós grado técnico	94	Sólido técnico
Clorpirifós técnico	94	Sólido técnico
Clorpirifós técnico	94	Polvo técnico
Clorver 3%/ Justo 3%/ clorpirifós 3%	3	Granulado
Compa 480	44.44	Concentrado Emulsionable
Chlorban técnico/ clorpirifós técnico	95	Sólido técnico
Cyren/ nufos/ predator 480 CE	44.5	Concentrado Emulsionable
Dursban F 94%	94	Sólido técnico
Dursban F 97%/ lorsban F/ dursban FM	97	Sólido técnico
Gard 480/ daring 480/ dart 480	44.5	Concentrado Emulsionable
Gusvan 1.5% polvo	3.5	Polvo
Gusvan 2.0% G	2	Granulado
Gusvan 3.0% G	3	Granulado
Gusvan 480 C.E.	40.80	Concentrado Emulsionable
Gusvan 500 P-H-	50	Polvo humectable
Kemuri 480	44.44	Concentrado Emulsionable
Kemuri técnico	94	Polvo técnico
Knoker 3 G	3	Granulado
Knoker 480	44.44	Concentrado Emulsionable
Legionario 94 técnico	94	Sólido técnico
Lorpac 3G/ attack 3G/ diafos 3G	3	Granulado
Lorsban 3% G/ control	3	Granulado
Lorsban 5G/ vexter 5G	5	Granulado
Lorsban 15 G	35	Granulado
Lorsban 480 EM/ solver/ bonanza/ magnum	44.5	Concentrado Emulsionable
Lorsban 50 W	50	Polvo humectable
Lorsban poliethylene D/ dursban poliethylene D	1	Pellet
Lorsban 480 CE/ lucapyr 480 CE/ thunder 480 CE	44.5	Concentrado Emulsionable
Pyrinex 94%	94	Polvo técnico

Continúa.....

Pyrinex 48 C.E.	44.44	Concentrado emulsionable
Pyrinex técnico	94	Polvo técnico
Robot 3G	3	Granulado
Robot 5G	5	Granulado
Titanic 3G/ Controla 3G	3	Granulado
Tyson 2E Tridente/ Termiban /Termifos	26.24	Concentrado emulsionable
Velban 480 E.C./ clorbn 480 E.C./ cloran 480	44.44	Concentrado emulsionable
Vexter	44.5	Concentrado emulsionable
Fuente: Comisión intersecretarial para el control del proceso y uso de plaguicidas, fertilizantes y sustancias tóxicas (CICOPLAFEST), 1995 Y 1998.		

la parte superior de la planta, quedando retenidos en las axilas de las hojas para que maten a las larvas que vayan a penetrar en la planta. En este caso se emplea a razón de 20 a 50 Kg./ha; pero en general se recomienda su uso en suelo en presiembra o postemergencia. Los criterios de aplicación recomendados para la aplicación en algunos otros cultivos agrícolas del insecticida clorpirifós se muestran en el cuadro 8. Cuando se aplica para el control de mosquitos se debe hacer con mochila aspersora manual o con aplicadores de bruma o humo o bien con equipo aéreo, también puede aplicarse con sumo cuidado en sistemas de riego (DelCañizo, 1990; Simental, 1990 y Thomson, 1992).

Las formulaciones granulares de este agroquímico destinados para el control de plagas de suelo, presentan mayor persistencia que las presentaciones de aplicación foliar, ya que la permanencia de este insecticida en gránulos se detecta hasta 70 días después de su aplicación (Hassall, 1990 y Ritcey *et al*, 1991). La capacidad de retención de este insecticida depende de las sustancias húmicas presentes en el suelo, ya que estas promueven en combinación con el producto insecticida la formación de uniones estables (Kong y Ma, 1999). Según Thomson (1992), en el suelo, agua contaminada, madera, concreto, etc., es efectivo por algunas semanas y es muy resistente a la filtración en el suelo. Su degradación se efectúa por rompimiento hidrolítico de la oxidación de fósforo a oxígeno (Metcalf, 1990).

Este insecticida presenta una toxicidad para mamíferos con un DL_{50} oral aguda para ratas de 96-276 mg/Kg. y un DL_{50} dermal para conejos de 2000 mg/Kg. El producto químico se destóxicifica en los animales por medio de la orina (Metcalf, 1990;

**CUADRO 8. CRITERIOS RECOMENDADOS PARA LA APLICACIÓN EN
ALGUNOS CULTIVOS DEL INSECTICIDA CLORPIRIFOS CONCENTRADO
EMULSIONABLE**

CULTIVO	PLAGA	DOSIS (L/ha).	OBSERVACIONES
Algodón	- Gusano belletero (<i>Heliothis zea</i>).	1.0- 2.0	<p>Cuando se observen de 6 a 8 larvas recién nacidas por 100 terminales muestreadas.</p> <p>Aplicar cuando se detecte el daño en las orillas.</p> <p>Aplicar cuando se detecten 10 adultos o ninfas por 100 redazos.</p> <p>Aplicar cuando se vean plantas trozadas.</p> <p>Aplicar cuando se vean plantas trozadas.</p>
	- Gusano soldado (<i>Spodoptera exigua</i>).	1.5	
	- Perforador de la hoja (<i>Bucculatrix thurberiella</i>).	1.0-2.0	
	- Chinche lygus (<i>Lygus spp.</i>).	1.0-2.0	
	- Gusano trozador (<i>Agriotis spp.</i>).	1.0-2.0	
Jitomate	- Minador de la hoja (<i>Liriomyza munda</i>).	1.0-2.0	<p>Aplicar cuando de 100 hojas 20 o 25 presenten una larva o más.</p> <p>Idem.</p> <p>Aplicar cuando las larvas estén recién emergidas, ya que en dicho estado de desarrollo son más susceptibles.</p>
	- Gusano soldado (<i>Spodoptera exigua</i>).	1.0-2.0	
	- Gusano trozador (<i>Spodoptera spp.</i>).	1.0-2.0	
Maíz	- Gusano cogollero (<i>Spodoptera exigua</i>).	0.5-1.5	Diríjase la aplicación a las hojas y el cogollo. Usar las dosis mayores en infestaciones más altas.
	- Gusano soldado (<i>Mythimna unipuncta</i>).		
Manzano	- Pulgón lanigero (<i>Eriosoma lanigerum</i>).	1.0-1.5 cc/lit agua	Aplíquese en huertos establecidos, la aplicación deberá ser dirigida al tronco y ramas donde estén localizadas las colonias de pulgones. Hágase una aplicación por temporada.
Sorgo	- Mosquita midge (<i>Contarinia sorghicola</i>).	1.5	Primera aplicación cuando más del 50% de panojas hayan iniciado su floración y se encuentren 1 o más mosquitas por panoja. Repítase el tratamiento cada tres días cuando el grado de infestación lo requiera.
- Gusano soldado (<i>Mythimna unipuncta</i>).			
- Gusano del fruto (<i>Heliothis zea</i>).			

Fuente: Boletín técnico informativo FMC Agroquímica de México, 1999.

Simental, 1990, Cremlyn, 1995 y CICOPLAFEST, 1995).

Puede ser tóxico a peces, aves silvestres, crustáceos y se considera muy peligroso a las abejas ya que es muy volátil (Simental, 1990 y Thomson, 1992). Pero no debe aplicarse en aves de corral ni en animales domésticos y ganado vacuno, según Hayes (1991), se puede acumular en dosis excesivas en el tejido adiposo de estos animales y excretarse en la leche de los mismos. En el ser humano es considerado como moderadamente peligroso y es irritante dérmico y respiratorio, muy tóxico por vía oral. Uno de los efectos bioquímicos es que afecta los niveles de colinesterasa en la sangre, ya que su mecanismo de acción radica en que es un inhibidor irreversible de la acetilcolinesterasa en la sangre (Metcalf, 1990; CICOPLAFEST, 1995 y TCYE, 2000). Esta sustancia, según reportes de la Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos (EPA) y TCYE (2000), se considera como no carcinogénico, ni mutagénico y tampoco teratogénico; además de no tener efectos adversos en la reproducción (probado en animales), pero casi toda la bibliografía consultada no está de acuerdo con lo anterior en este aspecto.

Este insecticida no se debe mezclar con productos de fuerte reacción alcalina, como son los arseniatos de calcio y sodio, polisulfuro de bario, caldo bordelés y sulfocálcico. ni con azufre humectable, tampoco con soluciones de fertilizantes que contengan este elemento ni con compuestos de cobre, ya que corroe los recipientes de cobre y de latón (DelCañizo, 1990; Simental, 1990; Thomson, 1992 y CICOPLAFEST, 1995). Sin embargo, se utiliza a este insecticida mezclado con otros insecticidas como el lindano, cypermetrina y algunos herbicidas como por ejemplo el cycloato (Avrova,

1990; Wilson y Hein, 1991; Revellin et al, 1996).

2.3.-Efecto tóxico del clorpirifós en las plantas.

2.3.1.- Intervalo de seguridad en las aplicaciones del clorpirifós.

Para el insecticida clorpirifós se debe dar un plazo o intervalo de seguridad, es decir, el tiempo razonable desde la aplicación hasta la cosecha del vegetal sin tener peligro alguno de residuos dañinos a la salud. DelCañizo et al (1990), mencionan que se debe tener un plazo de seguridad de 21 días para cualquier cultivo en general y de 30 días en cultivos aprovechados por sus raíces, en lo que se refiere a las formulaciones granuladas, la CICOPPLAFEST (1998), reporta que los intervalos de seguridad para cualquier cosecha de fruto y fresa es de 1 semana, 2 semanas para manzana, peral, zanahoria, cereales y 3 semanas para cualquier otra cosecha. Rosenstein (1994), indica que los intervalos de seguridad para soya, algodón, maíz, sorgo, trigo, alfalfa y arroz es de 21 días, para tomate de 1 día, en chile y pepino de 7 días, en manzano de 28-34 días, para el frijol de 20-60 días, en caña de azúcar de 60 días y para cítricos el plazo de seguridad es de 34 días. Según el ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación (1994) de España, el plazo de seguridad para el clorpirifós en cebo granulado "pellets" que se utiliza en plátano y vid es de 15 días, para los gránulos para esparcir o localizar en vid es de 21 días, para el líquido emulsionable en tomate y vid es de 21 días, el polvo para espolvoreo utilizado también en vid es de 15 días, en el polvo mojable para suspensiones utilizado en tomate, pimiento y vid es de 21 días y para el líquido para aplicación convencional para cualquier otro cultivo es de 10 días.

2.3.2.- Efecto tóxico del clorpirifós en las plantas.

Este producto es de gran cobertura de uso, ya que es un plaguicida de materia activa politóxica, es decir, que es menos selectivo (Carrero, 1996).

El interés fundamental por el insecticida clorpirifós radica en que se ha reportado fitotoxicidad en algunas plantas (cuadro 9). Un estudio realizado por Beck *et al* (1991), es un ejemplo de la fitotoxicidad que puede causar el insecticida clorpirifós, ya que en árboles de toronja (*Citrus paradisi* Macfayden), limón (*Citrus limon* L. Burman) y naranja (*Citrus sinensis* L. Osbéck cv. Washington Navel), evaluaron los siguientes tratamientos para el combate de la escama roja (*Aonidiella auranti* Maskell): 1) clorpirifós 4.52 Kg. de i.a. / ha (Lorsban 4E) más aceite agrícola y 2-4-D, 2) clorpirifós 4.52 Kg. de i.a. / ha (Lorsban 4E) más aceite agrícola, 3) clorpirifós 4.52 Kg. de i.a. / ha. (Lorsban 4E) más 2-4-D, 4) clorpirifós 4.52 Kg. de i.a. / ha. (Lorsban 4E), 5) clorpirifós 4.52 Kg. de i.a. / ha. (Lorsban 50W) y 6) un control con agua. Encontraron que debido a las aplicaciones de este insecticida solo se presentan deformaciones en la cáscara de estos frutos, que consisten en severas ralladuras longitudinales y múltiples en diversos sectores de éstos y que además estas alteraciones se incrementan aún más en combinación de este insecticida con aceite agrícola y 2-4-D. La confirmación de que estos daños se deban a la acción única del insecticida se justifica según estos autores a que las deformaciones naturales o inducidas de este tipo en los frutos cítricos no son usuales, salvo el causado por los hongos *Botrytis cinerea* Persoon y *Diaporthe citri* Wolf, que no es el caso de estas lesiones; además se comprobó que el aceite usado con el insecticida no afecta en el desarrollo de las

**CUADRO 9. FITOTOXICIDAD REPORTADA EN ALGUNAS PLANTAS
CAUSADA POR EL INSECTICIDA CLORPIRIFOS.**

NOMBRE	OBSERVACIONES
Anturio (<i>Anthurium andraceanum</i>).	Aplicando dosis de 2 Kg./ha (700 gr. de i.a. como concentrado emulsionable).
Poinsettia o Nochebuena (<i>Euphorbia pulcherrima</i>).	No se reporta.
Ficus crotón (<i>Ficus benjamina</i>) Alfalfa (<i>Medicago sativa</i> L.).	No se reporta.
Azalea (<i>Rhododendron spp.</i>)	Fitotoxicidad en hojas con presencia de bajas temperaturas o con oscilaciones térmicas diarias acusadas en dosis de 1 Kg./ha. (aproximadamente 400 gr. de i.a., como concentrado emulsionable).
Camelia (<i>Camelia japonica</i> L.).	No se reporta.
Vid (<i>Vitis vinifera</i> L.).	Tratamientos tempranos en algunas variedades.
Rosal (<i>Rosa spp.</i>).	No se reporta.
Laurel (<i>Ficus retusa</i>).	No se reporta.
Lino (<i>Linum usitatissimum</i> L.).	En combinación con el insecticida cypermetrina, en dosis de 800 gr. /ha., inhibiendo la maduración de la panoja.
Petunia (<i>Petunia spp.</i>).	No se reporta.
Cissus (<i>Cissus spp.</i>).	No se reporta.
Coliflor (<i>Brassica oleracea</i> L.):	Solución al. 0.15%; al momento del trasplante para el control de la larva <i>Delia radicum</i> .
Helechos (<i>Adiantum capillus-veneris</i> ; <i>Platycerium bifurcatum</i> ; <i>Polypodium filix-max</i> ; <i>Ctenis sloaneis</i> y <i>Nephrolepis exaltata</i>).	No se reporta.
Hiedra (<i>Hedera helix</i>).	No se reporta.
Citricos (<i>Citrus spp.</i>):	Sólo o en combinación con aceite agrícola para brindarle mayor adherencia y 2,4-D, en dosis de 4.52 Kg. de i.a./ ha., causa ralladuras en los frutos y elongaciones en las yemas florales en los arboles.
Olivo (<i>Olea europea</i> L.):	No se reporta.
Papaya (<i>Carica papaya</i>).	No se reporta.

Fuente: Hata y Hara, 1988; Avrova, 1990; Goebel y Jacquemard, 1990; Simental, 1990; Beck et. al., 1991; Berljin, 1991; Grout, 1992; Steene, 1992 y Ministerio de Agricultura de España, 1994.

ralladuras en estos frutos y que el 2-4-D en combinación con el clorpirifós, a pesar de tener antecedentes de que puede causar fitotoxicidad en el follaje y producir frutos cilíndricos en ciertas dosis, no induce ralladuras en los frutos cítricos. Este producto se aplicó durante el período de post-floración, momento en el cual según estos autores este producto causa una alteración en el desarrollo y en la fisiología del árbol y durante el cual las yemas son muy susceptibles a estas aplicaciones ya que inducen elongaciones en el crecimiento de las yemas florales y por consecuencia una alteración en el crecimiento y desarrollo de los frutos. Estas ralladuras son el resultado de un incremento en el tamaño celular, es decir de alargamientos de las células que constituyen el parénquima del fruto a consecuencia de este insecticida, dado que el clorpirifós tiene acción directa en el DNA de las células carpelares este induce una poliploidia quimera y por consecuencia una expansión celular. Este daño se considera grave, ya que afecta seriamente la calidad del producto y por lo tanto causa una baja en el precio de este en el mercado.

Las mezclas de cypermetrina y clorpirifós en estudios realizados en Senegal contra la plaga de la cápsula del algodón (*Heliothis armigera*), se ha descubierto que estos insecticidas tienen efectos sinérgicos, es decir, que al actuar juntos, aumentan el efecto de uno y otro (Goebel y Jacquemard, 1990). En el cultivo de lino (*Linum usitatissimum L.*) en combinación también con cypermetrina, inhibe la maduración de la panoja, reflejándose ésta en los valores de hemicelulosa y celulosa en las fibras de este vegetal, por lo cual no se producen fibras largas, que son las más deseables para la utilización a que se destina este cultivo (Avrova, 1990).

El insecticida clorpirifós en dosis de 2.2 a 4.5 Kg. / ha. causa daño en la remolacha azucarera (*Beta vulgaris* L. cv. Hilleshog Mono-Hy 55), el cual se refleja en un necrosamiento de este vegetal. Este daño se ha detectado en Hawaii, USA, pero esta alteración no ha afectado el porcentaje de sacarosa en este cultivo. Una de las formas en que este producto puede causar mayores daños a este cultivo, lo constituye cuando se combina con algunos herbicidas como el cycloato; estos productos se aplican al momento de la siembra incorporando el insecticida en forma granulada al suelo, ya que hay una interacción entre ambos y ésta se refleja en una reducción a la resistencia a plagas, enfermedades y malezas, disminuyendo así la producción de remolacha (Wilson y Hein, 1991).

2.3.3.- Residualidad del insecticida clorpirifós.

Se han encontrado residuos de este plaguicida, al aplicarlo en solución del 0.1% en costales para grano de maíz y arroz bajo condiciones de almacenamiento afectando la semilla y la mazorca en maíz. Estos residuos pueden oscilar de entre 0.1-0.8 mg/Kg , si se considera que el límite aceptable de residuos a nivel internacional es de 0.1 mg/Kg , después de 6 meses de aplicación, esto si es un caso grave, a pesar de que la práctica de lavar el arroz y el maíz, antes de cocinarlos reduce estos residuos desde un 59% hasta al 100% (Tejada et al, 1990).

Con dosis de 0.6 g de ingrediente activo por un litro, se presentan residuos de este insecticida en vástagos de durazno (*Prunus persica* L.), después de 80 días de aplicado (Hassall, 1990). En Chile, en frutales para exportación como el kiwi (*Actinidia spp.*), este insecticida es aplicado en dosis por debajo de 2 ppm para el

control de las plagas *Proevlia chrysopteris* y *Aspidiotus nerii*, el cual es el límite de tolerancia para Europa y los Estados Unidos, y para el Japón este límite es de sólo 0.5 ppm; pero el problema que se ha presentado con este plaguicida y en general con los insecticidas organofosforados, es que las características de la cáscara de dicha fruta puede contribuir en la detección de residuos de estos insecticidas, lo cual afecta su comercialización en los mercados anteriormente mencionados (González, 1989).

La Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos (EPA), 2000; establece la tolerancia para el clorpirifós en manzano de 1.5 ppm; proveniente de México (Rosenstein, 1994)

Este insecticida en forma granular en dosis de 2.2 Kg / ha., aplicado al momento de la siembra en los surcos para el control de la plaga *Delia antiqua* (Meigen) en el cultivo de la cebolla (*Allium cepa* L.). En Ontario, Canadá, se han detectado residuos de este plaguicida en bulbos inmaduros (de 64 a 76 días después de la siembra), con un nivel mayor en las raíces y piel exterior de aproximadamente 0.09 a 1.02 mg/Kg (Ritcey et al, 1991). La actividad residual del clorpirifós es aprovechada en Alabama y Florida, USA, en el cultivo de cacahuete (*Arachis hypogaea* L. cv. "Florunner") contra la plaga *Elasmopalpus lignosellus* (Zeller), presente en el suelo, haciendo aplicaciones de 2.2 Kg/ha. en forma granular al momento de la plantación, ya que este plaguicida tiene la capacidad de eliminar hasta el 56% de la población en estado larvario de esta plaga después de 67 días de aplicado al suelo; aún cuando el suelo contenga un 0.5% de materia orgánica (Mack et al, 1991). Este producto aplicado como concentrado emulsionable en dosis

que van de 5 a 10 lb de i.a./ gal / acre en árboles de naranja cv. Navel y cv. Valencia y en toronja roja, en California, USA, para el control de la escama roja de California (*Aonidiella aurantii* Mask), presenta residuos que no cumplen con las tolerancias de seguridad, después de 60 días de aplicado este producto en la cáscara y en la pulpa de estos frutos en un rango mayor de 0.3 ppm de este insecticida (Iwata *et al*, 1983).

La residualidad y la efectividad de este insecticida se ve reflejada en que aún en dosis de 0.08 ppm de i.a. (aproximadamente 150 ml/ha. de i.a. como concentrado emulsionable), este producto es capaz de causar una mortalidad de casi el 10% de la población plaga de la sanguijuela del arroz (*Chironomus tepperi* Skuse), después de 7 días de sembrado el cultivo contenido en la semilla tratada con el clorpirifós (Stevens, 1991).

La tolerancia establecida por la EPA (2000) para diversos productos agropecuarios se pueden observar en el cuadro 10. Por otra parte, esta agencia menciona que la contribución teórica de residuo máximo para los residuos del clorpirifós en la dieta humana se calcula de 0.5637 mg / día. La toma diaria aceptable de este producto es de 0.003 mg / Kg /día.

Asimismo la FDA (The Food and Drug Administration de los Estados Unidos), ha establecido que las tolerancias para el clorpirifós en productos alimenticios agrícolas es de 0.05 a 15 ppm (ATSDR, 1996). La toma permisible máxima es de 0.18 mg /día. Para esta agencia las tolerancias para la mayoría de las mercancías agrícolas crudas son apoyadas por datos actuales de química de residuos.

CUADRO 10. TOLERANCIA ESTABLECIDAS POR LA AGENCIA DE PROTECCION AMBIENTAL DE LOS ESTADOS UNIDOS (EPA, 2000) PARA DIVERSOS PRODUCTOS AGROPECUARIOS.

EVALUACION DE TOLERANCIA	PARTES POR MILLON
Melocotón	0.05
Cebolla (bulbo seco)	0.5
Guisante forrajero	1.0
Pera	0.05
Ciruelo	0.05
Calabazas	0.1
Vegetales de vaina y semilla	1.0
Sorgo, forraje	0.75
Sorgo, grano	0.5
Soya	0.5
Soya, forraje	8.0
Fresa	0.5
Papa	0.1
Tomate	0.5

Fuente: Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos (EPA, 2000), vía internet.

2.4.- Ciclo celular y mitosis en células meristemáticas.

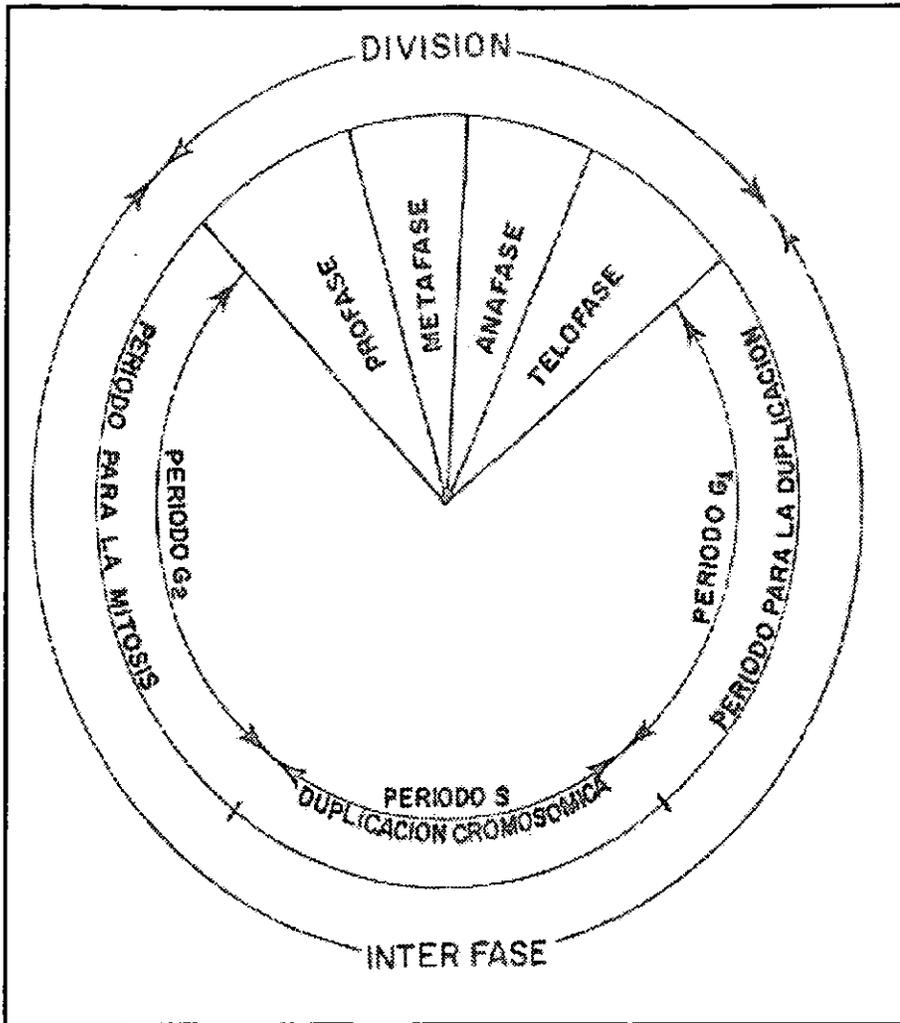
2.4.1.- Ciclo celular.

El ciclo celular es la duplicación de todos los constituyentes de la célula, seguida de su división en dos células hijas (Vilée, 1994). El ciclo celular se divide en cuatro fases: la fase M, la fase G₁, la fase S y la fase G₂. La fase M representa la mitosis (e incluye la división celular), las fases G₁, S y G₂ en conjunto constituyen la interfase (figura 3) (Wallace *et al*, 1991).

La interfase es una fase de gran actividad metabólica, durante la cual se origina una síntesis y duplicación de los cromosomas y de DNA, así como de otros elementos necesarios para la división celular, y en el curso de la división mitótica simplemente los cromosomas se separan (García, 1990 y Vilée, 1994). En la interfase el núcleo aparece granuloso, con excepción del nucléolo y los segmentos heterocromáticos de los cromosomas (García, 1990), en el cual los cromosomas aparecen como cadenas, delgadas y difusas, normalmente difíciles de distinguir (Singer y Berg, 1993).

Fase G₁. El tiempo entre la división mitótica y el comienzo de la duplicación de DNA se denomina fase G₁ o fase de "intervalo 1". En esta fase los cromosomas se descondensan o desenrollan en cuanto cada nueva célula hija entra en G₁. Este es un período muy activo, durante el cual la célula sintetiza las enzimas y las proteínas estructurales necesarias (sobre todo proteínas no histonas "P.N.H."), para el crecimiento celular, además de la síntesis de Acido Ribonucleico (RNA). Esta etapa es la de mayor duración en los vegetales. En este período, cada cromosoma está compuesto por una

FIGURA 3. CICLO CELULAR



Fuente: García, 1990.

doble cadena de DNA sin duplicar asociada con histonas y otras proteínas cromosómicas (Wallace et al, 1991)

La fase S. Es el período de replicación del DNA. Se lleva a cabo la síntesis de proteínas llamadas histonas (P.H.) y éstas se asocian con las moléculas de DNA (Tamarín, 1990; Wallace et al, 1991 y Vilee, 1994). En la fase S no hay simplemente una duplicación de la cantidad de DNA en el núcleo, sino también una réplica exacta de DNA de cada cromosoma. Al término de la fase S, el núcleo de la célula contiene dos complementos totales de material genético y entra a la fase G₂ (Sheeler y Bianchi, 1993).

La fase G₂. Esta es una fase de preparación a la mitosis e incluye las etapas finales en la preparación de la célula para su división, durante ella aumenta la síntesis de proteínas principalmente no histonas y RNA. Las proteínas del huso mitótico son sintetizadas en este momento, en preparación para la división nuclear siguiente (Wallace et al, 1991). El término de G₂ está marcado por el comienzo de la división mitótica, la fase M. La entrada a la fase M se caracteriza por la condensación de los cromosomas en el núcleo de la célula (Tamarín, 1990 y Vilee, 1994).

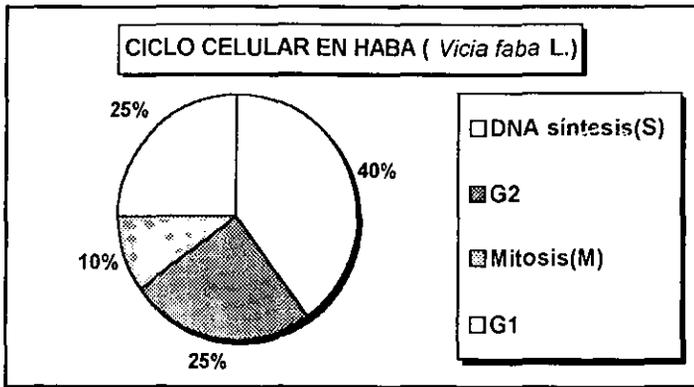
En células meristemáticas de haba (*Vicia faba* L.), el ciclo celular tiene una duración aproximada de 29 horas a una temperatura entre 22° y 23°C, es decir, a temperatura ambiente (figura 4) (Tamarin, 1990 y Wallace et al, 1991). El tiempo de las fases está distribuidas de la siguiente manera:

- La fase G₁: 12 horas.
- La fase S: 6 horas.

- La fase G₂: 8 horas.
- Mitosis: 3 horas.
- Total = 29 horas.

La mitosis en haba (*Vicia faba* L.), tiene una duración aproximada total de 3 horas bajo determinadas condiciones (García, 1990).

FIGURA 4. CICLO CELULAR EN HABA (*Vicia faba* L.).

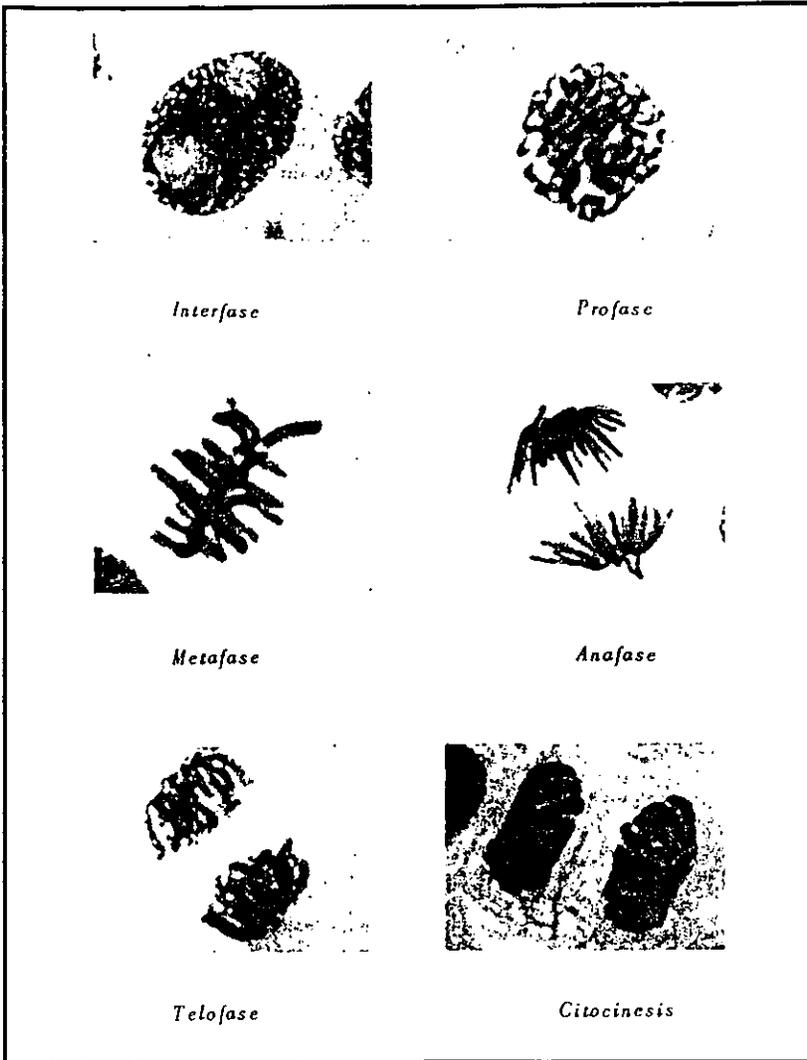


Fuente: Tamarín, 1990.

2.4.2.-Mitosis.

Hay tejidos cuya función reside exclusivamente en la producción de nuevo material celular y se les denomina meristemos. Los de las plantas son los ápices vegetativos de las raíces y de los brotes así como el cambium. El proceso divisional que conduce a la formación de nuevos núcleos y células es la mitosis (figura 5) (Singer y Berg, 1993 y Savín, 1995).

FIGURA 5. FASES DE LA MITOSIS EN CELULAS MERISTEMATICAS VEGETALES.



Mitosis en Haba (*Vicia faba* L.). Fotomicrografías por J. Curtis P.
Fuente. Curtis, J. (1976).

La mitosis comprende la regularidad de un proceso continuo de división celular que garantiza que cada célula hija recibirá exactamente el mismo número y tipo de cromosomas que tenía la célula madre o progenitora (Tamarin, 1990 y Villed, 1994).

La mitosis se refiere a la división del núcleo en dos núcleos hijos (cariocinesis) y a la división del citoplasma para formar dos células hijas (citocinesis), cada una de las cuales contiene uno de los núcleos. La división nuclear y la división citoplásmica, aunque casi siempre coordinadas, son procesos separados y distintos (García, 1990 y Villed, 1994). Como resultado de la mitosis, los núcleos resultantes mantienen el mismo número e identidad de los cromosomas de la célula de la cual derivan (Savín, 1995). De los núcleos de un meristemo tan sólo un porcentaje muy reducido se encuentra en división. En el caso de los meristemos de los ápices radicales de las plantas, que resultan muy indicados para el estudio del desarrollo mitótico, las cifras oscilan entre el 6 y el 15%; los restantes núcleos se encuentran en interfase. Los cromosomas están completamente desespiralizados, de modo que resultan inidentificables al microscopio óptico. Los cromosomas son cromatina condensada (estrechamente empacada) en cuerpos grandes muy visibles. La cromatina a su vez es DNA que forma un complejo con proteínas. Estas proteínas cromosómicas son de dos tipos: las histonas y las no histónicas (Wallace et al; 1991).

La función de la mitosis consiste en reproducir idénticamente todos los genes y los cromosomas existentes en el núcleo y distribuir de una manera exacta estas unidades resultantes entre dos núcleos hijos (Savín, 1995).

Para fines de estudio, el proceso de la mitosis se divide en cuatro fases:

- Profase
- Metafase
- Anafase
- Telofase

Profase. Esta comienza con la condensación de los filamentos de cromatina, lo que da lugar a que los cromosomas aparezcan como una masa enmarañada dentro del núcleo, es decir, los cromosomas se espiralizan y se hacen aparentes como estructuras filamentosas largas que longitudinalmente aparecen formadas por dos unidades, llamadas cromátidas (del griego cromos = color), es decir, cada mitad del cromosoma doble. Estas cromátidas son una manifestación visible de la replicación cromosómica la cual fue hecha en un momento previo en la fase “S” del ciclo celular (Tamarín, 1990).

A medida que avanza la profase, los cromosomas se acortan y engruesan, las cromátidas manifiestan más su estado helicoidal y se muestran íntimamente apareadas en toda su longitud, dado que las cromátidas quedan unidos al centrómero y que permanece así hasta la fase de metafase, se forma el huso acromático, y el o los nucleolos van disminuyendo de tamaño hasta que desaparecen junto con la membrana o envoltura nuclear (Tamarín, 1990; García, 1990; Villee, 1994). La condensación de los cromosomas implica esencialmente el enrollamiento de cada fibra de DNA (Wallace *et al.*, 1991). El nucleolo en esta fase de la mitosis se observa como un cuerpo oscuro dentro del núcleo (Tamarín, 1990).

Condensados los cromosomas, eliminada la envoltura o membrana nuclear y su RNA que pasa al citoplasma, entonces los cromosomas se disponen alineados en el plano ecuatorial del huso acromático que se formó a su alrededor. Esto señala el fin de la profase. El huso acromático es una estructura compuesta por microtúbulos o cuerpos cilíndricos y en plantas superiores corre de polo a polo y tiene como función principal mover los cromosomas hacia el plano ecuatorial. Esta estructura se forma de nuevo en cada ciclo celular y se dismantela después de la mitosis. El huso mitótico está formado por tubulina, una proteína compuesta de dos esferas diferentes de polipéptidos. Las esferas de tubulina se usan en la formación de los microtúbulos del huso (García, 1990; Wallace *et al.*, 1991 y Villed, 1994).

Metafase. El corto periodo en que los cromosomas están en el plano ecuatorial constituye la metafase. Esta se inicia con la organización del huso acromático al cual cada cromosoma se asocia por medio del centrómero. El movimiento de los cromosomas lo producen las fibras de microtúbulos pertenecientes al huso, los cuales se unen a cada cromosoma en el centrómero (Wallace *et al.*, 1991). Este movimiento de los cromosomas hacia el ecuador es conocido como metacinesis. La separación de los cromosomas hijos, señala el principio de la anafase (García, 1990; Wallace *et al.*, 1991 y Villed, 1994).

Anafase. En esta fase los cromosomas se separan y cada grupo de cromosomas hijos, inician su movimiento hacia los polos opuestos del huso acromático, separándose

inicialmente en la región del centrómero. Para este movimiento se divide el centrómero y las dos cromátidas se separan por completo en dos cromosomas hijos. En esta fase de la división celular cada cromosoma muestra un tamaño y forma particulares que se mantienen de célula a célula, lo que los hace individualmente identificables. El centrómero resulta perfectamente visible como un hueco que no se tiñe. Esto ocurre ya que las fibras que constituyen el huso acromático en presencia de ATP, atraen a los cromosomas a los polos. Los cromosomas que se desplazan hacia los polos suelen adoptar forma de “V” con el centrómero en el vértice señalando hacia el polo. La fuerza, que desplaza al cromosoma hacia el polo se aplica en el centrómero (García, 1990 y Villee, 1994).

Cuando por aberraciones cromosómicas llegan a presentarse cromosomas dicéntricos (con dos centrómeros) o acéntricos (sin centrómero) durante la anafase las cromátidas de los primeros se moverán cada una hacia un polo diferente, por lo cual se forma un “puente dicéntrico” que en telofase puede romperse. El cromosoma acéntrico no se mueve sobre el huso acromático y generalmente se pierde (García, 1990).

Telofase. Llegadas las cromátidas o cromosomas hijos a los polos, comienza la telofase. Los cromosomas se alargan y vuelven a la posición de reposo, sólo con filamentos de cromatina y gránulos visibles, se inicia la reconstitución de la membrana nuclear a partir del retículo endoplásmico y desaparecen los microtúbulos del huso acromático. Se forma el nucleolo y los cromosomas nuevamente se dispersan, dentro de los dos núcleos formados. Esto termina la división nuclear, también llamada cariocinesis, a la que sigue

la división del cuerpo de la célula, la citocinesis. La división se acompaña de la formación de una placa celular en la región ecuatorial del huso, la cual se prolonga hasta la pared celular. Cada célula hija forma entonces una membrana celular en el lado de la placa, formándose finalmente las paredes celulares de celulosa sobre cada lado de la placa celular (García, 1990 y Vilee, 1994). La célula entonces, entra nuevamente a la fase G₁, del ciclo celular (Tamarín, 1990).

El proceso de mitosis asegura la distribución precisa y equitativa de los cromosomas en cada uno de los dos núcleos hijos de cada célula. Los cromosomas contienen en su DNA información genética codificada, y el proceso de mitosis regular y ordenado garantiza también que esta información genética sea exactamente distribuida en cada uno de los dos núcleos hijos (Vilee, 1994).

El ciclo celular dura aproximadamente 24 horas en numerosos materiales vegetales, aunque es asimismo posible que transcurra a mayor o menor velocidad, dependiendo de algunos factores como la temperatura (Savín 1995). El porcentaje de células de un meristemo cuyos núcleos se encuentran en mitosis se denomina frecuencia mitótica. Que en el caso de la haba (*Vicia faba L.*), la frecuencia mitótica oscila entre un 11.2 y el 14.3% (García, 1990).

La mitosis en haba (*Vicia faba L.*), que es un material estándar para numerosos estudios citológicos según García (1990), tiene una duración total de 3 horas bajo determinadas condiciones de cultivo como son la temperatura propia del laboratorio, variedad, etc.; de los cuales se obtienen para los distintos periodos los valores siguientes a 26°C:

- ♦ Profase 95 min.
- ♦ Metafase 35 min.
- ♦ Anafase 23 min.
- ♦ Telofase 27 min.

2.5.-Importancia de la evaluación genotóxica.

El problema de la exposición de las plantas a un número creciente de agroquímicos, como los insecticidas, ha dado lugar a un interés creciente en el desarrollo de métodos para detectar los posibles efectos tóxicos de dichas sustancias. Entre los impactos más comunes que pueden tener los insecticidas es la de provocar la producción de sustancias mutagénicas en el ambiente, por lo cual la toxicología genética permite entender los mecanismos de acción de los agentes que inducen toxicidad y estimar el riesgo al que están expuestas las plantas y organismos vivos en general, cuando están en contacto con ellos (Restrepo, 1998 y Rodríguez *et al*, 1998a). Así, las respuestas celulares a cualquier tipo de exposición pueden determinarse y ser evaluadas utilizando diferentes metodologías y bioensayos (Orozco, 1999). Los agentes genotóxicos son sustancias que afectan principalmente el material genético de las células, con propiedades físicas y químicas que les permiten interactuar directa o indirectamente con los ácidos nucleicos y que poseen por lo tanto, actividad mutagénica (Guillén, 2000).

El actual resurgimiento de los estudios genotóxicos ha hecho que en el presente existan hasta más de 200 pruebas de bioensayo para evaluar y detectar la genotoxicidad de agentes contaminantes ambientales desconocidos (Grover y Satwinderjeet, 1999).

Los estudios para identificar el potencial genotóxico de una sustancia se pueden realizar tanto en células somáticas como en germinales, cumpliendo con distinta función en cada tipo celular. Las pruebas que pueden emplearse para realizar estos ensayos se clasifican en 4 grupos:

- 1.-Ensayos para detectar lesiones génicas.
- 2.-Ensayos para detectar lesiones cromosómicas.
- 3.-Daños primarios al DNA.
- 4.-Transformación oncogénica.

Estudios recientes han demostrado que la realización de bioensayos utilizando como bioindicadores a las plantas son un excelente método para el monitoreo o detección de daño ambiental. Entre las que más se utilizan están la cebolla (*Allium cepa* L.), haba (*Vicia faba* L.) y tradescantia (*Tradescantia spp.*), estas se han estado utilizando por más de 60 años por diversos autores; inicialmente para estudiar los efectos mutagénicos de radiaciones iónicas y mutágenos químicos, pero más recientemente se ha demostrado que son un excelente indicador para evaluar la mutagenicidad y clastogenicidad de contaminantes ambientales, ya que son muy sensitivas a la presencia de éstos. Ello aunado a la simplicidad para realizar dichos ensayos y su relativo bajo costo, los hacen muy versátiles y por ser de requerimientos

fáciles y mínimos, los han hecho una prueba de ensayo confiable y recomendable para un constante monitoreo ambiental ya que éstos constituyen una primera alerta de riesgo a la presencia de agentes potenciales mutágenos en el agua, aire y suelo, elementos que son esenciales para la vida (Grover y Satwinderjeet, 1999; Gopalan, 1999). Aunque se tienen que hacer un número determinado de bioensayos para determinar el nivel de toxicidad de alguna sustancia química, como por ejemplo los insecticidas, poco se ha hecho para determinar el daño en mutaciones génicas y cromosómicas en plantas superiores (Mohammed y Ma, 1999).

La prueba seleccionada para el presente trabajo es la de micronúcleos (MN), que se encuentra entre los estudios que detectan alteraciones a nivel del cromosoma. La formación de MN es uno de los procesos inducidos por la interacción de los agentes genotóxicos con las moléculas de DNA. (Amer y Farah, 1983a; Lu, 1992).

2.6.-Definición y antecedentes de la prueba de micronúcleos (MN).

Los micronúcleos son corpúsculos intracitoplasmáticos de cromatina separados del núcleo principal y en adición a él, que se producen por la ruptura de fragmentos acéntricos de cromosomas o bien de cromosomas completos que sufren un rezago anafásico durante la mitosis o meiosis, originados en forma espontánea o inducida (Schmid, 1975; Heddle *et al.*, 1983 y Guillén, 2000). La presencia de micronúcleos en telofase, pone en evidencia la pérdida de cromosomas o de segmentos cromosómicos, o de cromosomas accesorios (Chauhan *et al.*, 1986 y Gustavino *et al.*, 1987). Los micronúcleos son visibles o evidentes en la subsecuente generación de células en la

interfase o anafase (Ma et al, 1995). La prueba de micronúcleos, utilizando ápices de raíces de plantas en general, esta desarrollada en base a las rupturas de fibras de DNA producidas, o de rupturas en las fibras del huso acromático dejando a los cromosomas completos, estos fragmentos de cromosomas forman pequeños y redondos núcleos de diminuta dimensión, después de un ciclo de división mitótica en las células meristemáticas.(Ji et al, 1999).

Los micronúcleos se forman por material de cromatina faltante y que es movido al otro polo durante la anafase en la mitosis. Este material de cromatina surge entonces como una disyunción anómala de cromosomas debido a las anomalías del huso acromático o a las rupturas de cromosomas que resultan en formación de fragmentos acéntricos, cromosomas dicéntricos y puentes de cromatina. De este modo, la inducción de micronúcleos sugiere que un contaminante ambiental es también un inhibidor del huso acromático o un clastógeno (Grover y Satwinderjeet, 1999). Es decir, que al inducir la formación de micronúcleos se produce un daño al DNA (Cotelle et al, 1999). Según Ji et al (1999); la formación de micronúcleos puede ser resultado de la fragmentación de cromosomas o bien de algunos cromosomas enteros perdidos en la subsecuente división nuclear de células dañadas en el transcurso de ésta.

Para identificar el potencial genotóxico y cuantificar el daño que pueda ocasionar el insecticida clorpirifós, se han realizado diversos estudios en roedores y humanos; estos últimos principalmente en trabajadores agrícolas expuestos a intoxicaciones crónicas ocasionadas por este producto, todas estas utilizando la técnica de micronúcleos (MN); ya que ésta es considerada con frecuencia como un indicador de

gran poder de resolución, eficaz, confiable, económica, rápida y de gran sensibilidad a la presencia de mutágenos (Rizzoni et al, 1987 y Gustavino et al, 1987). Según Ma et al (1995) la técnica de inducción de micronúcleos, utilizando *Allium cepa* y *Vicia faba*, se viene efectuando desde 1930 y en 1976 se desarrolló esta técnica utilizando *Tradescantia spp*; con la evaluación del gas dibomil etileno. La principal ventaja de utilizar esta última especie es su incapacidad de reproducirse asexualmente, además de presentar homogeneidad genética muy segura entre planta y planta y entre experimento y experimento (Ma et al, 1994). Así esta prueba permite estudiar y evaluar el efecto mutagénico en humanos (linfocitos humanos), bacterias, animales (ratones principalmente, utilizando eritrocitos policromáticos), insectos como la mosca de la fruta (*Drosophila melanogaster*) y en vegetales utilizando células meristemáticas de raíz de haba (*Vicia faba* L.), cebolla (*Allium cepa* L.), polen e inflorescencias de tradescantia (*Tradescantia spp*), maíz (*Zea mays* L. cv. waxy) y cebada (*Hordeum vulgare* L.) (De Marco et al, 1986; Gustavino et al, 1987; Rizzoni et al, 1987; Ma et al, 1994; Gollapudi et al, 1995 y Cotelle et al 1999). Para identificar y evaluar el potencial de toxicidad genética del insecticida, Gollapudi et al (1995), utilizando a la bacteria (*Salmonella typhimurium*) y cultivos celulares in vitro e in vivo de linfocitos de ratas y ratones, aplicaron el insecticida mezclado con aceite de maíz en dosis de 10 ml/ Kg de peso vivo y encontraron que esta mezcla no induce actividad alguna de genotoxicidad, es decir, no ocasiona un incremento significativo en la frecuencia de aberraciones cromosómicas, ni micronúcleos.

Sin embargo, estudios realizados por Amer y Fawzia (1992), con cultivos celulares primarios de bazo de ratón in vitro, encontraron efectos citogenéticos del insecticida clorpirifós, utilizando las concentraciones de 1.4×10^{-6} , 2.8×10^{-6} , 5.7×10^{-6} y 11.4×10^{-6} M, encontrando que este pesticida, a estas concentraciones, induce aberraciones cromosómicas tales como un mayor porcentaje de metafases poliploides, fragmentaciones en los cromosomas y segmentación de éstos en la etapa de metafase, además de un significativo aumento en la frecuencia de intercambio de cromátidas hermanas (ICH's), observando que estos daños aumentan conforme aumenta la dosis.

Los daños causados por este insecticida no se limitan a un daño externo, ya que Amer y Farah (1983b), usando concentraciones saturadas de 0.5, 0.25 y 1.25 en solución saturadas, en células apicales de raíz de haba (*Vicia faba* L.), y después de 24 horas de inmersión; notaron un porcentaje anormal de mitosis en células de este vegetal, incrementándose conforme aumenta la dosis de este producto; afectando el número de profases, metafases y anafases con disturbios y alargamientos irregulares en los cromosomas; así como presencia de micronúcleos en células en interfase.

Rodrigues (1998b), menciona que el clorpirifós en dosis de 10 a 50 ppm de i.a., es capaz de tener un grado de clastogenicidad, ya que puede inducir hasta casi el doble la frecuencia de micronúcleos en maíz, soya y tradescantia; en cebada este producto puede causar daños en las fases mitóticas y meióticas en células de raíz y polen, de este vegetal. También este producto en dosis de 10 a 50 ppm tiene efectos severos en los cromosomas provocando fragmentaciones, disturbios en la fase de la anafase y alteraciones en la clorofila en hojas de especies como *Gossypium barbadense*, *Vicia*

faba L. y Hordeum vulgare L.

Los meristemos mitóticos de raíz de haba se han utilizado para estudios de aberraciones cromosómicas en los Estados Unidos por la Agencia de Protección Ambiental (EPA), en el programa Gene-Tox desde los años 80's y recientemente por el International Program On Chemical Safety, además de determinar que esta especie vegetal es igualmente recomendable que *Tradescantia spp.*, para medir la clastogenicidad de muestras de suelo contaminado (Ma et al., 1995 y Wang, 1999). El mejoramiento del protocolo de realización de esta técnica, utilizando raíces de *Vicia Allium* fué establecido en un standard internacional por la International Program On Plant Bioassays bajo auspicios de la United Nations Environment Programme (Ji et al., 1999).

Con esta técnica se ha hecho posible evaluar la genotoxicidad de diversos insecticidas como el diazinón, paratión, folidol, dieldrin, rogor, deltametrin y sevin, además de herbicidas como lo son el 2, 4 - D, glifosato, amitrol, alaclor, atrazina, dicamba, picloram, simazina, metolacoloro, etc. Por ejemplo, entre los antecedentes sobre el efecto de algunos productos agroquímicos, se encuentran los realizados por Samborska (1992), la cual trabajó con haba (*Vicia faba L.*) en los que evaluó el efecto citogenético de los herbicidas desecantes reglone (ingrediente activo diquat) y harvade 25F (ingrediente activo dimetipin) en dosis de 1.5, 3.0 y 4.5 lts./ ha. en condiciones de campo, encontrando que estos productos causan un incremento en la frecuencia de aberraciones cromosómicas, principalmente en las fases de anafase y telofase, siendo mayormente en telofase, induciendo rupturas, fragmentaciones, condensaciones,

disturbios en la esperilización de cromosomas, así como una inhibición en la creación o formación del huso acromático y cambios en la estructura nuclear de la interfase, esto aunado a una escasa estimulación de la división celular, la frecuencia de aberraciones aumenta conforme aumenta la dosis de estos productos. Estos daños fueron confirmados por la misma Samborska (1993), con haba y con los mismos productos herbicidas, sólo que ahora utilizando una concentración de 0.025% de los productos en solución bajo condiciones de laboratorio, encontrando igualmente que estos herbicidas son capaces de inducir a estas dosis, aberraciones cromosómicas, tales como rupturas, fragmentación, condensaciones y destrucción de cromosomas, dominando la aberración del tipo de contracción cromosómica, en su mayoría en metafase que en telofase, además de un incremento en la frecuencia de micronúcleos y un decrecimiento en la división celular. Según esta autora, los ingredientes activos de estos productos afectan directamente al DNA en las células de este vegetal y que además la inducción de aberraciones cromosómicas se producen mayormente en la fase S y G₂.

Estudios realizados por De Marco et al (1992), utilizando la prueba de micronúcleos en haba (*Vicia faba* L.), con los herbicidas glifosato (en dosis de 35, 70, 105, 140, 350, 700, 1050 y 1400 ppm) y atrazina (en dosis de 175, 350, 525, 700, 1750, 3500, 5250 y 7000 ppm) en suelos agrícolas con diferentes concentraciones de materia orgánica, se encontró que estos productos químicos interactúan con la materia orgánica presente en el suelo y que ésta es capaz de absorber el herbicida e inhibir la toxicidad de éstos, por lo tanto, estos productos no inducen un incremento significativo de micronúcleos, es decir, no hay efecto genotóxico por parte de los herbicidas ni una

reducción en el crecimiento de las raíces de haba bajo tales condiciones.

2.7.-Importancia del estudio de la prueba de MN.

Dentro de las pruebas de bioensayo utilizando como biomonitor a las plantas validadas y autorizadas por la International Programme on Chemical Safety (IPCS) desde 1996, están los siguientes:

1.- Prueba de micronúcleos en células meristemáticas de raíz en haba (*Vicia faba* L.) y cebolla (*Allium cepa* L.). Consiste en obtener células meristemáticas de raíz de estas especies y exponerlas a un determinado tiempo con las sustancias a evaluar, para posteriormente cortar los ápices, tratarlos con alguna solución fijadora y teñirlos para observación al microscopio y cuantificar número de micronúcleos y fases mitóticas (Cabrera y Rodríguez, 1999).

2.- Prueba *Tradescantia*- Stamen- Hair- Mutation (Trad-SHM). En esta prueba se obtienen plantas de *Tradescantia spp* en invernaderos, se cortan las inflorescencias y éstas se exponen a las soluciones presumiblemente mutagénicas a un determinado tiempo (de 24 a 30 horas aproximadamente); para después de 8 a 14 días del tratamiento agudo se espera que aparezcan en los estambres florales mutaciones de color rosa en las flores cortadas. Ya obtenido lo anterior, estos se someten a glicerina y se les realiza una disección para su observación (Cabrera y Rodríguez, 1999).

3.- Prueba de micronúcleos utilizando *Tradescantia* (Trad-MCN). En esta prueba se obtienen plantas de invernadero. Las flores se cortan y ponen en tratamiento en un tiempo determinado en la solución presumiblemente genotóxica, esta técnica nos

permite observar cromosomas de fase en profases tempranas meióticas. Posteriormente las jóvenes inflorescencias se fijan en una solución Farmer y se pasan a etanol al 70% durante 24 horas aproximadamente para posteriormente teñir con aceto-carmin (Cabrera et al, 1999). Esta es una prueba citogenética basada en la formación de micronúcleos, los cuales resultan de rupturas de cromosomas en el polen meiótico de células de este vegetal (Rodrigues, 1998a).

Estas pruebas también incluyen a la especie *Arabidopsis thaliana* para determinar mutagenicidad, la cual se refleja en alteraciones clorofilicas y embrionarias de este vegetal, y en *Vicia faba* L. se utilizan para evaluar únicamente aberraciones cromosómicas (Sandhu et al, 1994; Rank y Nielsen, 1997).

Según Cabrera y Rodríguez (1999), la prueba de micronúcleos utilizando *Tradescantia spp*, es más sensible a los posibles efectos genotóxicos inducidos por sustancias químicas que la prueba de Tradescantia-Stamen-Hair-Mutation. La International Programme on Chemical Safety (IPCS), tiene un programa para el monitoreo ambiental. Dentro de este programa se ha establecido el International Programme on Plant Bioassays (IPPB), creado para el monitoreo y observación de agentes genotóxicos en el ambiente contaminado, es decir, realizando un monitoreo regular de la genotoxicidad de contaminantes en aire, agua y suelo, utilizando cualquiera de las 3 pruebas antes mencionadas, teniendo este programa un fuerte impulso en China.

La República Popular China desde 1980, ha establecido a la prueba de micronúcleos como bioensayo oficial de genotoxicidad para monitoreo de aire, agua, y suelo contaminados.(Gopalan, 1999). Otra de las finalidades de este último programa ha sido la de estandarizar el protocolo de realización de estas pruebas y con esto reducir la variabilidad inter-laboratorio (Grover y Satwinderjeet, 1999).

La técnica de micronúcleos utilizando células meristemáticas de raíz de haba (*Vicia faba* L.) (VR-MCN; Vicia root-micronucleus) como sistema biológico de detección, es de gran utilidad para mostrar y medir el potencial genotóxico de muchas exposiciones agudas de sustancias químicas en el ambiente y medios acuosos y es considerada como relativamente sencilla y ampliamente usada en diversos lugares con diferentes climas y tipos de suelo, esto en condiciones de laboratorio o in situ (Ma et al, 1995; Ji et al, 1999). Por ejemplo esta prueba ha servido para determinar niveles de polifosfatos generados por detergentes en aguas residuales, mostrando que estas sustancias tienen efectos clastogénicos; esta técnica también recientemente se está realizando para medir la toxicidad total en individuos expuestos a mezclas de químicos con posibles adsorciones a través de vía dérmica, para la medición de genotoxicidad causada por la radiación de los rayos ultravioleta, además de ser utilizado para detectar la genotoxicidad de iones de metales pesados como el cadmio, zinc, níquel, vanadio, cobre y el cromo en el ambiente y ríos contaminados, ya que éstos inducen tumores en animales y humanos expuestos; con estos estudios genotóxicos se ha determinado que en especies como cebolla (*Allium cepa* L.), haba (*Vicia faba* L.) y Tradescantia (*Tradescantia spp.*), estos iones inducen una reducción en el crecimiento de las raíces,

retraso en la división celular y aberraciones cromosómicas reflejadas en la anafase de la mitosis, y daños en el huso acromático (Minissi y Lombi, 1997; Minissi et al, 1998; Steinkellner et al, 1998; Knasmüller et al, 1998; Wang, 1999; Wang y Wang, 1999 y Ford,; 2000). Una de las características de la prueba de micronúcleos utilizando como bioindicador *Vicia faba* L., es que es un ensayo simple, económico, rápido y eficiente para determinar la clastogenicidad en muestras de agua colectadas de cualquier cuerpo de agua y aunado a las características como color, turbiedad o densidad óptica, materiales suspendidos y olor de las muestras colectadas dan una referencia adicional de la clastogenicidad (Miao et al, 1999).

La prueba de micronúcleos se ha utilizado con especies como la tradescantia (*Tradescantia* clon 4430, híbrido resultante de *Tradescantia hirsutiflora* y *T. subcaulis*), para medir la radiactividad en ambientes contaminados (Grant et al, 1992 y Ma et al, 1994). Recientemente se ha utilizado para esta prueba a *Tradescantia pallida* (Rose) Hunt. cv. *purpurea* como bioindicador que permite determinar los efectos clastogénicos de partículas contaminantes originadas de la combustión de gasolinas en el medio urbano de Soã Paulo, Brasil y así monitorear la posible genotoxicidad en el ambiente. Esta variedad de *Tradescantia* es muy común en las jardineras de calles y avenidas de esta ciudad, siendo esta planta igual de sensible que la tradescantia clon 4430 y 03 de uso estándar en esta prueba (Batalha et al; 1999). Esta prueba también se ha utilizado como biomonitor para determinar el contenido de contaminación por herbicidas agrícolas (motolacoloro, atrazina y 2,4-D) en

sedimentos de pozos de agua en la cual se ha determinado que estos productos son potencialmente genotóxicos en *Tradescantia* clon 4430, al inducir aberraciones cromosómicas y aumentar a casi el doble la frecuencia de micronúcleos en comparación con las pruebas control evaluadas (Kong y Ma, 1999).

Cabrera y Rodríguez (1999), con esta misma especie han determinado la genotoxicidad de contaminantes generados por infiltraciones de rellenos sanitarios a los mantos acuíferos subterráneos y en la que estos contaminantes han inducido en la planta bioensayo una inhibición en la división celular y una disminución en el índice mitótico. Igualmente, Cabrera et al (1999), utilizando *Tradescantia* clon 4430 han evaluado el potencial genotóxico de compostas provenientes de basureros municipales.

En un estudio realizado por Mohammed y Ma (1999), se muestra la utilización de la técnica de micronúcleos utilizando *Tradescantia* clon 4430 y la prueba de *Tradescantia*-Stamen-Hair-Mutation, para la evaluación de los efectos clastogénicos y mutagénicos del insecticida organofosforado dimetoato y los herbicidas atrazina, simazine, dicamba y picloram, en presentaciones líquidas y gaseosas; encontrando que el insecticida dimetoato en forma gaseosa puede incrementar los eventos de mutación y reducción en el número de estambres por filamento conforme se aumenta la dosis, a su vez con el herbicida picloram en forma líquida en dosis de 100 ppm el comportamiento es similar, pero el dicamba y el picloram en dosis de 5 a 200 ppm en forma líquida

incrementa sustancialmente la frecuencia de micronúcleos conforme se aumenta la dosis y en *Tradescantia paludosa* y *Vicia faba* L. este producto causa viscosidad en el citoplasma y destrucción de la estructura nuclear, reducción del índice mitótico reduciendo a pedazos a los cromosomas o bien induciendo a que éstos sean anormales; a dosis de 100 ppm en *Vicia faba* L. los cloroplastos de hoja provenientes de este vegetal tratado se presentan muy pequeños y numerosos, además de que en dosis de 200 ppm induce necrosis en las células que se destinaban para observar fases de mitosis. En estudios observados por estos autores se menciona que el dicamba tiene efectos morfológicos y citológicos en trigo y cebada, causando malformaciones en los tallos y retrasos en la maduración, así como el desarrollo de semillas anormales y que estas semillas muestran una reducción constante en el número de divisiones celulares cuando se incrementa la concentración de este producto. En estudios genotóxicos se ha observado que induce rupturas de cromosomas y formaciones de células multinucleadas en dosis de 10 ppm. En cebada este producto induce aberraciones cromosómicas tales como anafases multipolares, rupturas y alargamientos cromosómicos en dosis de 100, 200 y 300 ppm, en una dosis extrema de 1000 ppm de dicamba este induce aberraciones que reflejan huecos nucleares, fragmentos de cromosomas, cromosomas en forma de bastón e hilos de cromatina delgados y alargados, puentes de cromatina, poliploidia y aumento en la frecuencia de micronúcleos (Mohammed y Ma, 1999).

Yang (1999), menciona que utilizando la prueba de micronúcleos con *tradescantia*, no sólo se puede determinar la genotoxicidad de agentes contaminantes potenciales sino que también es muy útil para evaluar la calidad del agua de cualquier

cuerpo de agua y que además esta prueba se puede complementar con un estudio químico, así ambos se pueden complementar y constituir una excelente estrategia de monitoreo ambiental biológico y químico a la vez, ya que la frecuencia de micronúcleos es un evidente indicador de la concentración de clastógenos en una muestra de agua (Miao et al., 1999).

La prueba de micronúcleos utilizando tradescantia, es muy versátil pues ha permitido determinar por ejemplo la genotoxicidad de rayos ultravioleta, utilizando como bioindicador *Tradescantia* clon O3, ya que algunos tipos de estos rayos pueden ser absorbidos fácilmente por las moléculas de DNA en la célula, los cuales pueden tener un daño genético en los seres vivos. Los rayos ultravioleta UV-B, son especialmente nocivos a las plantas ya que pueden ocasionar una inhibición en la germinación de polen de *Tradescantia spp* y aumentar la frecuencia de micronúcleos; esto es particularmente importante ya que este tipo de rayo se puede incrementar en cualquier tipo de establecimiento industrial (Wang y Wang, 1999).

También con esta prueba ha sido posible detectar la genotoxicidad de emisiones gaseosas de incineradores de basureros municipales, ya que éstas contienen contaminantes orgánicos e inorgánicos y tienen potencial mutagénico y carcinogénico, los cuales inducen una elevada frecuencia de micronúcleos (Fomin y Hafner, 1998).

La técnica de micronúcleos utilizando cebolla (*Allium cepa* L.) como bioindicador ha servido para determinar los efectos genotóxicos de aguas residuales generadas por zonas industriales, en las que éstas pueden inducir aberraciones cromosómicas, es decir, daños de cromosomas en la anafase durante la mitosis de este

vegetal, así como un incremento en la frecuencia de micronúcleos (Grover y Satwinderjeet, 1999).

La prueba de micronúcleos con *Allium/ Vicia* y *Tradescantia spp* es muy eficiente en la detección del potencial clastogénico de extractos acuosos de suelo ya que estos son recomendables para determinar la genotoxicidad en muestras de suelo contaminado (Cotelle et al, 1999). Asimismo la prueba de micronúcleos utilizando *Tradescantia spp* (Trad-MCN) y la prueba de Tradescantia-Stamen-Hair-Mutation, no sólo son muy recomendables para determinar la genotoxicidad potencial de gases y líquidos ambientales sino que también lo son para determinar la genotoxicidad de los rayos ultravioleta, rayos X y neutrones y de cualquier mutágeno químico (Mohammed y Ma, 1999; Wang y Wang, 1999).

La detección de los efectos genotóxicos de iones de metales pesados según Knasmüller et al (1998), usando una prueba de mutagenicidad es muy problemático, ya que en *Tradescantia spp* se puede evaluar la genotoxicidad de los metales aplicando el suelo contaminado con estos metales directamente en las plantas a evaluar mientras que en *Vicia faba* L. lo más recomendable es utilizar extractos acuosos de suelo que contengan los metales que se pretenda detectar su potencial mutagénico. Esto último se ha confirmado por estudios realizados por Minissi y Lombi (1997), al evaluar la actividad mutagénica de iones de metales pesados tales como zinc, cadmio, níquel, vanadio y cobre en sedimentos del río Tiber en Roma, Italia, al colocar estos sedimentos en germinación con la semilla de haba y realizando la prueba de micronúcleos, se

encontró una respuesta negativa por parte de este vegetal, es decir, no hubo un incremento significativo en la frecuencia de micronúcleos con respecto al control (agua). Otra especie vegetal que también se ha utilizado para determinar el efecto genotóxico de iones metálicos en la cebada (*Hordeum vulgare* L.), por ejemplo con este vegetal se han podido determinar los efectos antagónicos de iones como calcio (Ca^{2+}), zinc (Zn^{4+}), selenio (Se^{4+}) y cadmio (Cd^{2+}), en la que se ha determinado que el cadmio puede inhibir la germinación en la semilla, el crecimiento de raíz, decreciendo el índice mitótico, induciendo además aberraciones cromosómicas y formación de micronúcleos, daños en la estructura nuclear y reducción de la fidelidad en la síntesis de DNA y RNA (Zhang y Xiao, 1998).

Este tipo de bioensayos, utilizando cualquiera de las especies vegetales como bioindicador, es mucho más simple, rápido y económico para determinar el nivel de contaminantes de cualquier cuerpo de agua, ya que el monitoreo químico sólo revela las cantidades y un limitado número de contaminantes, pero no demuestra el efecto de estos contaminantes, especialmente los efectos sinérgicos y antagónicos de las mezclas complejas contenidas en el agua (Miao *et al.*, 1999).

2.8.- El haba (*Vicia faba* L.) como material biológico.

Los meristemas de ápices de raíces en crecimiento activo son la fuente más conveniente de material somático para el estudio del número, morfología y “conducta” de los cromosomas mitóticos. Estudios realizados con anterioridad han mostrado que los cromosomas de las plantas son excelentes materiales para mostrar los grandes y

sensitivos cambios en el medio ambiente causados por sustancias químicas (Chauhan *et al.*, 1986). Las células mitóticas meristemáticas de raíces de las plantas son además apropiadas y eficientes materiales citogenéticos para la detección de clastogenicidad de contaminantes ambientales (Ma *et al.*, 1995). Un sistema de prueba vegetal muy útil para la detección de la actividad genotóxica de los agroquímicos lo constituyen las células meristemáticas de la raíz de haba (*Vicia faba L.*), que ofrecen un amplio espectro de posibilidades de análisis citogenéticos. Los exámenes en las etapas de metafase y/o anafase son los más utilizadas en el estudio de micronúcleos (MN), ya que sus cromosomas son pocos, grandes y perfectamente visibles, por lo que son ideales para la observación de los efectos citogénéticos de los agentes químicos (Gómez y Villalobos, 1997).

Vicia faba L. es un sistema vegetal muy útil para la detección de la actividad genotóxica de los contaminantes ambientales. Es un sistema barato, de fácil manejo, de fácil adquisición y no requiere equipo sofisticado ni condiciones estériles. Los meristemas de su raíz contienen células en diversas etapas de la mitosis, principalmente en metafase que es la más utilizada en el estudio citogenético. El hecho de tener pocos cromosomas 6 pares ($2n=12$), y de ser muy grandes, además de la gran proporción de actividad de división celular lo hacen un material excelente para la observación de los efectos mutagénicos de los agentes tóxicos y excelente para la realización de la prueba de micronúcleos y de aberraciones cromosómicas. También es importante mencionar que *Vicia faba* posee la fracción metabólica S10 capaz de transformar promutágenos en mutágenos, aspecto relevante ya que muchos agentes químicos que no

son mutágenos por sí mismos, requieren del metabolismo animal o vegetal para activarse y provocar daños al DNA. *Vicia faba* ha sido propuesta como un biomonitor citogenético para evaluar mutágenos ambientales en el programa de genotoxicidad de la Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos (EPA) (Kanaya et al., 1994 y Gómez y Villalobos, 1997).

3.-MATERIALES Y METODOS.

3.1.-Material biológico.

La realización del presente estudio se hizo en el laboratorio de bioquímica, fisiología y genética vegetal de la carrera de Ingeniería Agrícola y utilizó semilla de haba (*Vicia faba* L.), adquirida en un mercado local.

3.2.-Materiales y reactivos.

- Insecticida clorpirifós. Nombre comercial Tyson 2E tridente, con una concentración del 26.24%, concentrado emulsionable.
- Sustrato para germinación: vermiculita.
- Cajas de petri.
- Hipoclorito de sodio.
- Tween 20.
- Alcohol etílico.
- Acido acético glacial.
- Solución tampón-citrato, pH = 4.2.
- Enzima pectinasa al 0.5%
- Acido clorhídrico 5N.
- Colorante aceto - orceína.
- Agua destilada.
- Estufa.
- Microscopio óptico.
- Agujas de disección.

- Vasos de precipitado de 500 y 1000 ml.
- Porta y cubre objetos.
- Pipetas de 1 y 5 ml.
- Pipeta Pasteur.
- Micropipeta.
- Bisturí.
- Tubos de ensayo de 10 ml.
- Mechero.
- Xilol.
- Resina.

3.3.-Metodología.

3.3.1.- Se escogieron semillas de haba (*Vicia faba L.*) las más sanas y homogéneas en cuanto a textura y tamaño, y se lavaron 5 veces con agua corriente. Se colocaron en 400 ml. de agua se le agregaron 46 ml. de cloro y 7 gotas de Tween 20 y se agitaron durante 20 minutos.

3.3.2.- Las semillas se dejaron remojando en recipientes que contenían las soluciones de insecticida clorpirifós en concentraciones de 0.5, 2.0, 3.0, 4.0 y 5.0 ppm. de ingrediente activo y un testigo (agua), durante 24 horas con la finalidad de ablandar a las semillas para acelerar y uniformizar la germinación, además de permitir una penetración más eficiente del insecticida. Las concentraciones utilizadas se propusieron en base a los niveles de tolerancia establecidos para este insecticida para la exportación a mercados

internacionales como Japón y Estados Unidos y de acuerdo a los antecedentes bibliográficos sobre bioensayos en plantas con algunos otros productos agroquímicos.

3.3.3.- Las semillas se sembraron en cajas de Petri, utilizando como sustrato vermiculita, que presenta partículas grandes para producción y chicas para la germinación, con buena capacidad de aireación y retención de humedad, de baja densidad, de pH cercano al neutro, libre de plagas y enfermedades, libre de sustancias tóxicas, fácil de mezclar y que permite uniformidad entre lotes.

3.3.4.- Las semillas se mantuvieron en condiciones de temperatura ambiente de laboratorio hasta que las raíces tuvieron una longitud de 2 a 3 centímetros, procediendo a cortar los ápices de una longitud aproximada de 3 milímetros.

3.3.5.- Se fijaron los ápices en una solución de etanol- ácido acético en proporción 3:1, durante 24 horas.

3.3.6.- Las raíces ya fijadas se transfirieron a una solución de etanol al 70% durante 15 minutos.

3.3.7.- Los ápices fijados se lavaron en una solución tampón citrato de pH= 4.2.

3.3.8.- Se incubaron en pectinasa 0.5% durante una hora en una estufa a 37°C.

3.3.9.- Transcurrido el tratamiento con pectinasa se trasladaron los ápices a maceración e hidrolización con HCl 5 N a temperatura ambiente durante 20 minutos.

3.3.10.- Los ápices fijados e hidrolizados se colocaron en un portaobjetos y se realizó el macerado de los ápices con ayuda de una aguja de disección y se colocó una gota de colorante aceto-orceína. Se colocó el cubreobjetos y se realizó el aplastado o squash.

Posteriormente se dejó secar al aire y se quitó el exceso con papel secante.

3.3.11.- Se observaron las preparaciones al microscopio con la finalidad de notar si éstas cumplían con los criterios de selección y si éstos se aceptaban, se montaban en definitivo.

3.4.-Análisis citogenético.

Para la evaluación de la frecuencia de micronúcleos (MN) en los tratamientos utilizados de 0.5, 2.0, 3.0, 4.0 y 5.0 ppm de i.a. respectivamente; cada tratamiento constó de 5 repeticiones. Por cada repetición se contaron 1000 células, para dar un total de 5000 células por tratamiento indicándose cuantas de ellas poseían micronúcleos.

Para la determinación del índice mitótico (IM) en los tratamientos utilizados de 0.5, 2.0, 3.0, 4.0 y 5.0 ppm de i.a., se observó cuantas células se encontraban en alguna fase mitótica, determinadas en 5 repeticiones de 1000 células cada una dando un total de 5000 células por tratamiento.

3.5.-Criterios para seleccionar células micronucleadas.

Los criterios de selección que se utilizaron fueron los siguientes:

- 1- Que las preparaciones presentaran una buena tinción.
- 2- Los micronúcleos debían distinguirse como pequeños corpúsculos circulares bien definidos con una coloración roja característica.
- 3- Los micronúcleos sólo deberían tener un diámetro tal que no exceda $1/3$ del núcleo principal y que estuvieran localizados dentro de la pared celular y en el área del citoplasma circundante al núcleo principal.

4- - Células con corpúsculos fusionados con el núcleo principal estuvieron excluidos, ya que éstos pueden ser el resultado de extrusiones nucleares o de procesos degenerativos.

5.-Los micronúcleos, no debían mostrar refractibilidad, es decir, que al momento de mover el micrométrico del microscopio el objeto no debía desaparecer o pasar a otro plano, ya que si esto se presentaba entonces se excluía como un micronúcleo.

3.6.-Análisis estadístico.

Para realizar el análisis estadístico se utilizó el programa estadístico INSTAT 2 versión 2.03 de Acevez (1990-1993); en la prueba de MN se utilizó un diseño completamente al azar y se realizó un análisis de varianza con la finalidad de determinar la significancia entre los tratamientos y a continuación se compararon los grupos de estudio por medio de la prueba de Tukey-Kramer con una $p=0.05$ y 0.01 .

4.-RESULTADOS.

El cuadro 11 muestra la frecuencia de micronúcleos presentada en cada uno de los tratamientos evaluados con el insecticida clorpirifós en células apicales de raíz de haba. En este cuadro se observa que el clorpirifós ocasionó mayor número de micronúcleos con la dosis de 2 ppm. Por otra parte, la dosis de 5 ppm fué la que mostró la menor frecuencia de micronúcleos, manifestándose que el aumento en la frecuencia de micronúcleos no va en función con el incremento de las concentraciones utilizadas del insecticida, tal como se presenta en la figura 6.

CUADRO 11. FRECUENCIA DE MICRONUCLEOS.

Dosis (ppm)	REPETICIONES					~ χ	Desviación estándar
	I	II	III	IV	V		
0.5	20	23	25	29	21	23.6	3.5
2.0	32	29	32	37	28	31.6	3.5
3.0	22	26	19	22	22	22.2	2.4
4.0	22	23	25	26	29	25	2.7
5.0	16	14	15	16	13	14.8	1.3
Testigo	3	4	4	5	6	4.4	1.1

Podemos apreciar en las microfotografías (figuras 8,9,10,11,12,13), la presencia de micronúcleos.

Los resultados obtenidos para el índice mitótico en las células apicales de raíz de haba, se presentan en el cuadro 12, el cual muestra que el índice mitótico fué mayor en el tratamiento de 5.0 ppm superando al promedio obtenido con el testigo. También se destaca que no existe un incremento en el número de fases mitóticas que

FIGURA 6. PROMEDIOS DE LA FRECUENCIA DE MN.

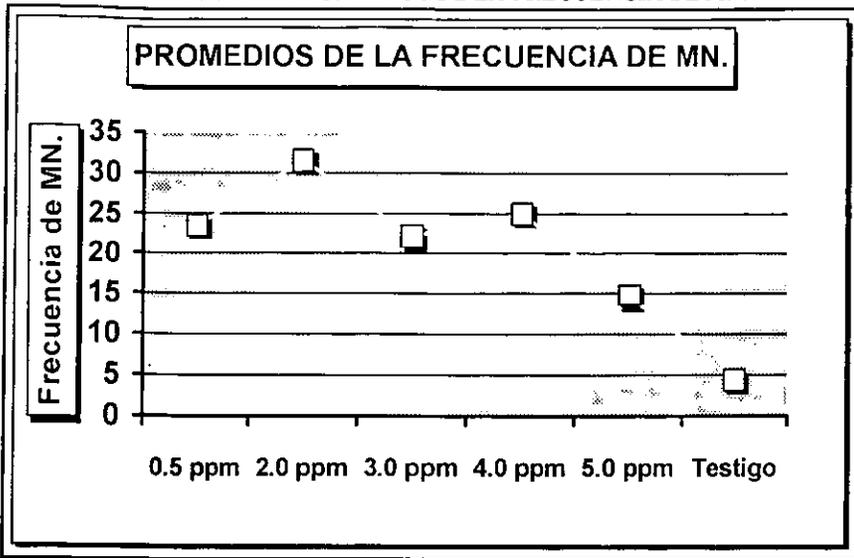


FIGURA 7. PROMEDIO DE LA FRECUENCIA DEL INDICE MITOTICO

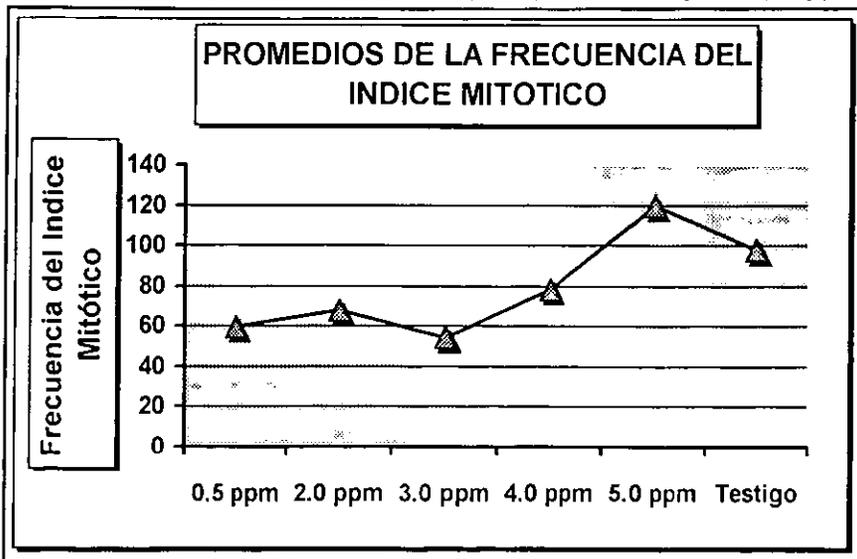
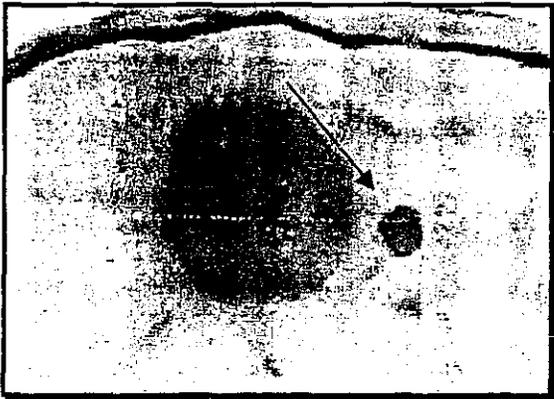


FIGURA 8. CELULA CON MICRONUCLEOS (1).



FIGURA 9. CELULA CON MICRONUCLEOS (2).



LAS FLECHAS SEÑALAN LA PRESENCIA DE MICRONÚCLEOS

FIGURA 10. CELULA DE *Vicia faba* L. EN PROFASE

PROFASE

FIGURA 11. CELULA DE *Vicia faba* L. EN METAFASE

METAFASE

FIGURA 12. CELULA DE *Vicia faba* L. EN ANAFASE.

ANAFASE

FIGURA 13. CELULA DE *Vicia faba* L. EN TELOFASE.

TELOFASE

vaya en función con el aumento de las dosis empleadas del clorpirifós, lo cual se puede observar en la figura 7.

CUADRO 12. FRECUENCIA DEL INDICE MITOTICO.

Dosis (ppm)	REPETICIONES					~ χ	Desviación Estándar
	I	II	III	IV	V		
0.5	56	50	65	69	59	59.8	7.4
2.0	60	74	63	72	68	67.4	5.8
3.0	43	54	64	52	60	54.4	8.0
4.0	73	66	84	94	75	78.4	10.8
5.0	99	121	119	134	126	119.8	12.9
Testigo	100	95	111	103	81	98	11.1

Se realizó el análisis estadístico de los resultados anteriores, primero se efectuó un análisis de varianza para la frecuencia de micronúcleos e índice mitótico para determinar el grado de significancia entre los tratamientos evaluados, presentándose una diferencia altamente significativa en ambos parámetros evaluados (cuadros 13 y 14).

Se realizó la prueba de comparación múltiple de Tukey-Kramer, para conocer la diferencia estadística entre los tratamientos evaluados tanto en la frecuencia de micronúcleos como en el índice mitótico.

Para la frecuencia de micronúcleos, la prueba indicó que existen diferencias altamente significativas entre el testigo y los demás tratamientos. También la prueba mostró que existen diferencias altamente significativas entre la dosis de 2.0 ppm en comparación con las otras dosis evaluadas.

Con respecto al índice mitótico, la prueba señaló que también existe una diferencia estadística entre el testigo y los tratamientos estudiados. Por lo que toca al tratamiento de 5.0 ppm, que mostró el mayor índice mitótico, en comparación con las otras dosis utilizadas, la prueba indicó una diferencia altamente significativa, pero con respecto al testigo fué únicamente significativa (Ver apéndice).

CUADRO 13. ANALISIS DE VARIANZA PARA LA FRECUENCIA DE MICRONUCLEOS.

FACTOR DE VARIACION (fv)	GRADOS DE LIBERTAD (gl)	SUMA DE CUADRADOS (sc)	CUADRADOS MEDIOS (cm)
Tratamientos	5	2236.7	447.33
Error	24	167.20	6.967
Total	29	2403.9	

Fc = 64.211

CUADRO 14. ANALISIS DE VARIANZA PARA LA FRECUENCIA DEL INDICE MITOTICO (IM).

FACTOR DE VARIACION (fv)	GRADOS DE LIBERTAD (gl)	SUMA DE CUADRADOS (sc)	CUADRADOS MEDIOS (cm)
Tratamientos	5	15609	3121.9
Error	24	2261.2	94.217
Total	29	17871	

Fc = 33.135

5.- DISCUSION DE RESULTADOS.

Es evidente que diversos estudios han demostrado que muchos insecticidas son responsables de aumentar el riesgo de toxicidad en las plantas. Entre los efectos tóxicos a los insecticidas se les han atribuido propiedades mutagénicas entre las que destacan las alteraciones cromosómicas, por lo que se les considera peligrosos agentes genotóxicos (De Marco *et al.*, 1992 y Samborska, 1992).

La genotoxicidad en los vegetales puede provocar graves daños económicos al estimular que aparezcan caracteres indeseables producto de mutaciones inducidas por los agroquímicos, y puede observarse también un deterioro en el vigor híbrido y rendimiento de las cosechas y, en última instancia, en los casos más graves se atenta contra el patrimonio genético de las semillas (Papale, 2000). Es por ello importante tomar en cuenta los estudios para la evaluación temprana del daño genotóxico, que como el presente estudio, tuvo como objetivo detectar el daño citogenético provocado por un insecticida.

Los resultados que se obtuvieron en el presente trabajo están apoyados en la prueba de micronúcleos, ya que esta técnica está considerada como un buen sistema para evaluar el daño genotóxico.

Con la técnica anteriormente mencionada, en el presente estudio se encontró que el insecticida clorpirifós resultó ser genotóxico en todas las concentraciones evaluadas como lo muestra el cuadro 11 y figura 6. Como puede observarse en dicho cuadro, se indujo un incremento en la frecuencia de micronúcleos con todas las concentraciones del clorpirifós empleadas.

Desde la concentración de 0.5 ppm el incremento en la frecuencia de micronúcleos resultó estadísticamente significativa con respecto al grupo testigo, siendo la concentración de 2.0 ppm la que indujo la mayor frecuencia de micronúcleos.

Cabe mencionar que entre sí, las concentraciones de 0.5, 3.0 y 4.0 ppm, no mostraron diferencia estadísticamente significativa y que no obstante la inducción de micronúcleos por parte del clorpirifós disminuyó en la concentración de 5.0 ppm, y se mantuvo con una diferencia altamente significativa con respecto al grupo testigo, como puede observarse en el cuadro A del apéndice. Este efecto genotóxico encontrado en el presente trabajo en *Vicia faba* L. está de acuerdo con los resultados de las investigaciones de toxicidad sobre plantas de Beck et al (1991), y de los estudios genotóxicos de Gollapudi et al. (1995), Amer y Fawzia (1992), Amer y Farah (1983a) y Rodrigues (1998a).

Otro aspecto muy importante que puso de manifiesto el presente estudio es que las concentraciones utilizadas de clorpirifós están dentro del rango correspondiente a algunas de las concentraciones de tolerancia establecidas por la EPA de los E.U.A. para diversos productos agropecuarios. Esto quiere decir que muy posiblemente los efectos fenotípicos sobre el vegetal no se han presentado aún, pero que según los resultados el daño al material genético ya está hecho.

Los resultados de este estudio también indican que no existió un efecto dosis-respuesta pues, como ya se mencionó, aunque todas las concentraciones produjeron un

incremento estadísticamente significativo en la frecuencia de micronúcleos con respecto al grupo testigo, entre las concentraciones de 0.5, 3.0 y 4.0 ppm no hubo diferencia estadística. Se observó además que la concentración intermedia de 2.0 ppm fue la que indujo la mayor frecuencia de micronúcleos y que la concentración de 5.0 ppm fue incapaz de superar la inducción de micronúcleos de cualquiera de las concentraciones menores.

Una posible explicación para los efectos anteriores podría ser el hecho de que el clorpirifós es un compuesto poco soluble en agua, por lo que al ir incrementando la concentración del compuesto se iba aumentando la inducción de micronúcleos como lo muestran los efectos encontrados en las concentraciones de 0.5 y 2.0 ppm que fueron las menores. Sin embargo, a concentraciones mayores se comienza a presentar la insolubilidad del compuesto que se acompaña de una disminución en su biodisponibilidad. Entendiéndose por biodisponibilidad el movimiento de la sustancia química entre los compartimentos o fases de un microecosistema. En este caso el microecosistema está formado por las células meristemáticas de la raíz de *Vicia faba* L. y el medio acuoso donde se encuentra el clorpirifós. Tal vez por esto a concentraciones mayores a 2.0 ppm no se obtuvo un efecto genotóxico directamente proporcional, ya que no penetró más compuesto al interior celular.

En este estudio, además de considerar la frecuencia de micronúcleos se determinó el índice mitótico, el cual representa la velocidad con que se lleva a cabo el ciclo celular. La alteración de este parámetro es otro aspecto que permite evaluar el

efecto citotóxico de una sustancia. Los resultados obtenidos presentados en el cuadro 12 y figura 7, mostraron que el clorpirifós modifica el índice mitótico ya que se produjo una disminución estadísticamente significativa de este parámetro en las concentraciones de 0.5, 2.0, 3.0 y 4.0 ppm. Esto indica que de alguna manera posiblemente por el daño cromosómico las células no se están dividiendo a la misma velocidad que las células de los meristemos que no fueron expuestos al clorpirifós.

El efecto citotóxico no se presentó en la concentración de 5.0 ppm. incluso el índice mitótico para esta concentración fue mayor que la del grupo testigo mostrando una leve diferencia estadística. Estos resultados son congruentes con la disminución en la frecuencia de micronúcleos obtenida para esta concentración y podrían ser también explicados como una disminución en la biodisponibilidad del compuesto que impide que no se alcance una concentración alta del insecticida en las células meristemáticas de *Vicia faba* L.

En la revisión bibliográfica revisada se encontró que la información sobre la capacidad genotóxica del clorpirifós en vegetales es escasa, no existen estudios *in vivo* ni *in vitro* de la inducción de micronúcleos en células vegetales, por lo que estos estudios serían los primeros en demostrar un efecto genotóxico de insecticidas exclusivamente en plantas y confirmarían la amplia capacidad de daño que tienen estos compuestos en las plantas cultivadas.

De lo anterior se deduce la importancia de estudiar la genotoxicidad de este tipo de compuestos, y de esta forma predecir sus efectos a corto plazo y en la medida posible evitarlos y controlarlos.

Los diferentes tipos de insecticidas no tienen una estructura química común, y la complejidad de estos compuestos químicos que pueden inducir genotoxicidad poseen un notable problema para tratar de entender el mecanismo de acción de estos agentes. La compleja composición química de estos productos, hacen difícil el conocimiento de cual sustancia o alguno de sus componentes son los responsables de dichos efectos tóxicos; por lo que todavía se requieren de más estudios, en donde se empleen dosis que puedan extrapolarse a la cantidad empleada en las plantas cultivadas, así como la determinación y seguimiento de los mecanismos de acción o inhibición de los agentes genotóxicos que puedan estar formando parte de estos compuestos.

6.-CONCLUSIONES.

1.- El insecticida clorpirifós incrementa significativamente la frecuencia de micronúcleos en las concentraciones estudiadas en comparación con el testigo, observándose que la dosis de 2.0 ppm fue la que manifestó el mayor número de micronúcleos, resultando que todas las dosis evaluadas inducen un daño genotóxico.

2.- El índice mitótico disminuyó en las concentraciones de 0.5, 2.0, 3.0 y 4.0 ppm con respecto al testigo; solamente con la dosis de 5.0 ppm se obtuvo un elevado índice mitótico, lo cual puede deberse en parte, a la baja biodisponibilidad que presenta el insecticida a esta concentración.

3.- Los micronúcleos presentes en el grupo testigo no tiene influencia (estadística) con la genotoxicidad observada en las concentraciones estudiadas del clorpirifós, pues representan el valor basal normal para este bioensayo.

4.- La actividad genotóxica del clorpirifós tanto en micronúcleos como en el índice mitótico no muestra una relación dependiente con las concentraciones estudiadas.

7.- RECOMENDACIONES Y SUGERENCIAS PARA TRABAJOS FUTUROS.

- La genotoxicidad de agroquímicos en vegetales es una área de investigación prácticamente desconocida en México, por lo cual se realizó el presente estudio con la finalidad de generar información sobre el daño genotóxico de insecticidas en plantas. Se espera que sirva a la comunidad de Ingeniería Agrícola para adentrarse en el tema, y que de esta manera se obtengan las bases teóricas para continuar con este tipo de investigaciones que en la práctica podrían ayudar a encontrar soluciones que permitan hacer una utilización racional de los agroquímicos, mediante una evaluación temprana de toxicidad a nivel genético en las plantas cultivadas, ya que no sólo es importante evitar el gasto económico de los productores al percatarse tardíamente de los efectos nocivos de los agroquímicos, sino también es muy importante preservar el patrimonio genético de las especies.

8.- BIBLIOGRAFIA.

- 1.- Agencia de protección ambiental de los Estados Unidos (EPA). 2000. Toxicology chapter for chlorpyrifos. U.S.A Documento de 63 páginas. www.epa/pesticides.htm.
- 2.- Agency for toxic substances and Disease Registry (ATSDR). 1996. Toxicological profile for Chlorpyrifos (Update). Atlanta U.S. Department of Health and Human Services. Public Health Service.
- 3.- Altamira I. J. y Hernández C. J. L. 1990. Producción de semilla de alfalfa (*Medicago sativa* L.) a partir de un cultivar establecido y diferentes distancias de roturación de suelo. Tesis profesional de Ingeniería Agrícola. FES- Cuautitlán. UNAM. México. pp 120-122.
- 4.- Amer, S.M. y Fawzia, A.E.A. 1992. Cytogenetic effects of pesticides. IV. Cytogenetic effects of the insecticides Gardona and Dursban. *Mutation Research* 279: 165-170.
- 5.- Amer, S.M. y Farah, O.R. 1983a. Cytological effects of pesticides. XII. Meiotic effects of the insecticide Dursban. *Cytologia* 48: 557-563.
- 6.- Amer, S.M. y Farah, O.R. 1983b. Cytological effects of pesticides. XII. Effects of the phosphorothioate insecticide dursban on the mitosis of *Vicia faba*. *Cytologia* 48: 27-33.
- 7.- Avrova, N.P. 1990. Effect of herbicides on raw flax fibres and their retting. *Tekhnicheskije Kultury*. 6: 35-37 (Abs.).
- 8.- Batalha, R.F.J. et al, 1999. Exploring the clastogenic effects of air pollutants in São Paulo (Brazil) using the *Tradescantia* micronuclei assay. *Mutation Research* 426: 229-232.
- 9.- Beck, N.G. et al 1991. The effect of chlorpyrifos on flower and fruit development in grapefruit, *Citrus paradisi* Mcfayden *Scientia Horticulturae.*, 47: 35- 50.
- 10.- Berljin, J. D. 1991 Manuales para producción agropecuaria. Cultivos básicos. Area producción vegetal No. 8. Segunda edición. Editorial Trillas. México. Pag. 33.
- 11.- Cabrera, G.L. y Rodríguez, D.M.G. 1999. Genotoxicity of leachates from a landfill using three bioassays. *Mutation Research* 426: 207-210.

ESTA TESIS NO SALE
DE LA BIBLIOTECA

- 12.- Cabrera, G.L. et al 1999. Genotoxicity of the extrats from the compost of the organic and the total municipal garbage using three plant bioassys. *Mutation Research* 426: 201-206.
- 13.- Calixto, C.N. 1990. El arroz su cultivo en México. Universidad Autónoma Chapingo. pp 115-130.
- 14.- Carrero, J. 1996. Lucha integrada contra las plagas agricolas y forestales. Ediciones Mundi-Prensa. Barcelona. pp 31-42.
- 15.- Chauhan, L.K.S. et al 1986. Efecto of deltamethrin on plant cells. I. Cytological effects on the root meristems of *Allium cepa*. *Mutation Research* 171: 25-30.
- 16.- Comisión intersecretarial para el control del proceso y uso de plaguicidas, fertilizantes y sustancias tóxicas (CICOPLAFEST). 1995. Catálogo oficial de plaguicidas. SAGAR, SEMARNAP, SSA y SECOFI. México. pp 85-86.
- 17.- Comisión intersecretarial para el control del proceso y uso de plaguicidas, fertilizantes y sustancias tóxicas (CICOPLAFEST). 1998. Catálogo oficial de plaguicidas. SAGAR, SEMARNAP, SSA y SECOFI. México. pp 405-450.
- 18.- Cotelte, S. et al 1999. Assesment of the genotoxicity of contaminated soil with the *Allium/Vicia*-micronucleus and the *Tradescantia*-micronucleus assays. *Mutation Research* 426: 167-171.
- 19.- Cremlyn. R. 1995. Plaguicidas modernos y su acción bioquímica. Editorial Limusa. México. Pag. 45; 111-112.
- 20.- Curtis Patiño, Jorge. 1976. Introducción a la citología vegetal. Universidad Autónoma Chapingo. Pag.131.
- 21.- DelCañizo, P. J. A. et al 1990. Guía práctica de plagas. 3 edición. Ediciones Mundi Prensa. Barcelona. pp 100-101.
- 22.- De Marco, A. et al 1986. Induction of micronucleated cells in *Vicia faba* and *Allium cepa* root tips treated with nitrilotriacetic acid (NTA) *Mutation Research* 171: 145-148.
- 23.- De Marco, A. et al 1988. Induction of micronuclei in *Vicia faba* root tips treated with heavy metals (Cadmium and Chromium) in the presence of NTA. *Mutation Research* 206: 311-315.

- 24.- De Marco, A. et al 1990. Induction of micronuclei in *Vicia faba* root tips treated in different soils with the herbicide alaclor. *Mutation Research* 241: 1-6
- 25.- De Marco, A. et al 1992. Importance of the type of soil for the induction of micronuclei and the growth of primary roots of *Vicia faba* treated with the herbicides atrazine, glyphosate and maleic hydrazide. *Mutation Research* 279: 9-13.
- 26.- Extensión Científica. 1996. Oregon State University. www.gcat.com.au
- 27.- FMC Agroquímica de México. 1999. Boletín técnico informativo. GOLPE 480 CE. México.
- 28.- Fomin, A. y Hafner, C. 1998. Evaluation of genotoxicity of emissions from municipal waste incinerators with *Tradescantia*-micronucleus bioassay (Trad-MCN). *Mutation Research* 414: 139-148.
- 29.- Ford, J. 2000. Dermoproducts PT y LTD. Genetic Consulting & Testing Pt y Ltd. Adelaide.
- 30.- García, V.A. 1990. Técnicas y procedimientos de citogenética vegetal. Tercera edición. Colegio de postgraduados. México. pp. 30-36.
- 31.- Goebel, R. y Jacquemard, P. 1990. Evaluation du niveau de sensibilité d'*Heliothis armigera* Hbn., déorédateur de la capsule du cotonnier, aux associations cyperméthrine-chlorpyrifos et cyperméthrine-méthoparathion. Etude des interactions possibles entre ces insecticides. *Coton et Fibres Tropicales*. 45 (2): 137-143 (Abs.).
- 32.- Gollapudi, B.B. et al 1995. Evaluation of the genetic toxicity of the organophosphate insecticide chlorpyrifos. *Mutation Research* 342: 25-36.
- 33.- Gómez, A.S. y Villalobos, P.R. 1997. El intercambio de cromátidas Hermanas en *Vicia faba* como monitor genético de contaminantes ambientales. En resúmenes del VII Congreso Nacional de Genética Universidad Autónoma de Baja California, Ensenada, B.C.
- 34.- González, R. H. 1989. Manejo de plagas del Kiwi en Chile: Degradación de residuos de los insecticidas clorpirifós y phosmet. *Revista frutícola*. 10 (2): 35-43.(Abs.).
- 35.- Gopalan, H.N.B. 1999. Ecosystem health and human well being: the mission of the International Programme on Plant Bioassays. *Mutation Research* 426: 99-102.

- 36.- Grant, W. F. et al 1992. The use of *Tradescantia* and *Vicia faba* bioassays for the *in situ* detection of mutagens in an aquatic environment. *Mutation Research* 270: 53-64.
- 37.- Grout, T. G. 1992. Two fruit abnormalities and their causes. *Citrus Journal*. 2 (1): 39-40.
- 38.- Grover, I.S. y Satwinderjeet, K. 1999. Genotoxicity of wastewater samples from sewage and industrial effluent detected by the *Allium* root: anaphase aberration and micronucleus assays. *Mutation Research* 426: 183-188.
- 39.- Guillén, A.O.H. 2000. Apuntes de clase de Citogenética FES- Cuautitlán, UNAM. México.
- 40.- Gustavino, B. et al 1987. A comparison between short- term evolution of micronuclei induced by X- rays and colchicine in root tips of *Vicia faba*. *Mutation Research* 192: 109 -119.
- 41.- Hassall, K. A. 1990. The biochemistry and uses of pesticides. Ed. VCH. Weinheim, 2ª de. Germany. Pag. 9; 35; 111-112; 121-122; 242-245.
- 42.- Hata, T. Y. y Hara, A.H. 1988. Phytotoxicity of insecticides and acaricides to anthuriums. Research Extension Series; Hawaii Institute of Tropical Agriculture and Human Resources. 97: 8.
- 43.- Hayes, W. J Jr. 1991. Handbook of pesticide toxicology. Volume 2. Clhasses of Pesticides. Academic Press HC. San Diego California. pp 1065-1067.
- 44.- Heddle, J. et al 1983. The induction of micronuclei as a messure of genotoxicity. *Mutation Research* 126: 61-118.
- 45.- Iwata, Y. et al 1983. Chlorpyrifos Applied to California Citrus: Residue Levels en Foliage and on and in Fruit. *Journal Agriculture Food Chemical*. 31 (3): 603- 610.
- 46.- Ji, Q. et al 1999. *Vicia* root- micronuclei assays on the clastogenicity of Water samples from the Kui River hear Xuzhou City, People's Republic of China. *Mutation Research* 426: 133-135.
- 47.- Kanaya, N. et al 1994. *Vicia faba* chromosomal aberration assay. *Mutation Research* 310: 231-247.
- 48.- Klaassen, C.D. 1991. Casarett & Doull's toxicology. 4ª Ed. Mc Graw-Hill. New York. Pp 883-905.

- 49.- Knasmüller, S. et al 1998. Detection of genotoxic effects of heavy metal contaminated soils with plant bioassays. *Mutation Research* 420: 37-48.
- 50.- Kong, M.S. y Ma, T.H. 1999. Genotoxicity of contaminated soil and shallow well water detected by plant bioassays. *Mutation Research* 426: 221-228.
- 51.- Lagunes, T. A. y Villanueva, J.J. 1994. Toxicología y manejo de insecticidas. Colegio de Postgraduados en Ciencias Agrícolas. Montecillos, México. pp 112- 124.
- 52.- Llanos, C. M. 1994. El maíz, su cultivo y aprovechamiento. Ediciones Mundi-Prensa. España. pp 44-50.
- 53.- López, T. M. 1994. Horticultura. Editorial Trillas. México. pp 177-281.
- 54.- Lu, F.C. 1992. Toxicología básica. Ed. Harla. pp 23-56.
- 55.- Ma, T.H. et al 1994. *Tradescantia* micronucleus bioassay. *Mutation Research* 310: 221-230.
- 56.- Ma, T.H. et al 1995. The improved *Allium/Vicia* root tip micronucleus assay for clastogenicity of environmental pollutants. *Mutation Research* 334: 185-195.
- 57.- Mack, T.P. et al 1991. Efficacy of selected Granular Insecticides in soil in "Florunner" peanut fields to larvae of lesser cornstalk Borer (Lepidoptera: Pyralidae). *Journal of Economic Entomology*. 84 (6): 1899-1904.
- 58.- Metcalf, R.L. 1990. Introducción al manejo de plagas de insectos. Editorial Noriega. México. pp 234- 456.
- 59.- Miao, M. et al 1999. *Vicia* root micronucleus assay on the clastogenicity of water samples from the Xiaoqing River in Shandong Province of the People's Republic of China. *Mutation Research* 426: 143-145.
- 60.- Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación de España. 1994. Manual de Productos fitosanitarios. Ediciones Mundi-Prensa, Madrid, España. pp.13-66, 78-79.
- 61.- Minissi, S. y Lombi, E. 1997. Heavy metal content and mutagenic activity, evaluated by *Vicia faba* micronucleus test, of Tiber river sediments. *Mutation Research* 393: 17-21.

- 62.- Minissi, S. et al 1998. Mutagenicity (micronucleus test in *Vicia faba* root tips), polycyclic Aromatic hydrocarbons and heavy metal content of sediments collected in Tiber river and its tributaries within the urban area of Rome. *Mutation Research* 420: 77-84.
- 63.- Mohammed, K.B. y Ma, T.H. 1999. Tradescantia- micronucleus and-Stamen hair mutation assays on genotoxicity of the gaseous and liquid forms of pesticides. *Mutation Research* 426: 193-199.
- 64.- Orozco, G.R. 1999. Estudio de la relación dosis - efecto de proteínas de choque térmico (HPS70) por exposición en metales en *Drosophila melanogaster*. En: 4º. Congreso Nacional Estudiantil de Toxicología Genética. Taxco, Guerrero; México. Pag
- 65.- Papale, S. 2000. Plaguicidas ¿Venenos útiles?. www.ecoportat.net/articulos/plagui.htm
- 66.- Parmjit, K. y Grover, I.S. 1985. Cytological Effects of some organophosphorus Pesticides. II. Meiotic effects. *Cytologia* 50: 199- 211.
- 67.- Rank, J. y Nielsen, M.H. 1997. *Allium cepa* anaphase-telophase root tip chromosome aberration assay on N-methyl-N-nitrourea, maleic hydrazide, sodium azide, and Ethyl methanesulfonate. *Mutation Research* 390: 121-127.
- 68.- Restrepo, R.J. 1998. Venenos: Del invento al uso y de la muerte a la vida. En: Memorias del III taller de Agricultura Orgánica. Mayo, 1998. México. Pag 41-72.
- 69.- Revellin, C. et al 1996. Effect of a mixture of chlorpyrifos and lindane on the Symbiosis of Bradyrhizobium japonicum and Soybean (*Glycine max.* L. Merrill). *Pesticide Science*. 36 (1): 69-74.
- 70.- Ritcey, G. et al 1991. Persistence and biological activity of residues of granular insecticides in organic soil and onions maggot. (Diptera): Anthomyiidae). *Journal of Economic Entomology*. 84 (4): 1339-1343.
- 71.- Rizzoni, M. et al 1987. Micronucleus induction by low doses of X- rays in *Vicia faba* root tips. *Mutation Research* 176: 205-209.
- 72.- Robles, S. R. 1990. Producción de oleaginosas y textiles. Editorial Limusa. 3ª Ed. pp 110-115.
- 73.- Rodríguez, G. S. et al 1998a. In situ assesment of pesticide genotoxicity in an integrated pest management program I- *Tradescantia* micronucleus assay. *Mutation Research* 412: 235-244.

- 74.- Rodrigues, G.S. et al 1998b. In situ assessment of pesticide genotoxicity in an integrated pest management program: II.- Maize waxy mutation assay. *Mutation Research* 412: 245-250.
- 75.- Rosenstein, S. E. 1994. Diccionario de especialidades agroquímicas. 5ª. edición. Editorial PLM. México. pp 221; 399-404; 557-558; 694-295.
- 76.- Roush, R. T. y Tabashnik B. E. 1990. Pesticide resistance in Arthropods. 3ª. edición. Chapman and Hall. London. Pag. 111; 185; 212; 219 y 227.
- 77.- Samborska, C.A. 1992. Changes in genetic material of *Vicia faba* L. var. minor caused by desiccants. I. Cytogenetic effects of dessicants applied under field conditions. *Genetica Polonica* 33 (4): 267- 272.
- 78.- Samborska, C.A. 1993. Changes in genetic material of *Vicia faba* L. var. minor caused by desiccants. II. Cytogenetic effects of dessicants applied under laboratory conditions. *Genetica Polonica* 34 (1). 27- 34.
- 79.- Sandhu, S.S. et al 1994. Results and recommendations. *Mutation Research* 310: 257-263.
- 80.- Savín, V.C. 1995. Procesos celulares. 2ª. edición. Editorial Trillas. México. pp. 63-69.
- 81.- Segura, M.A. 1990. Plaguicidas agrícolas. Una introducción a su conocimiento. Universidad Autónoma Chapingo. México. pp. 65-95.
- 82.- Schmid, W. 1975. The micronucleus test. *Mutation Research* 31: 9-15.
- 83.- Sheeler, P. y Bianchi, D.E. 1993. Biología celular. Editorial Limusa. México. pp. 79-82; 504-508.
- 84.- Simental, S.C. 1990. Agroquímicos. Insecticidas (Acaricidas, ovicidas y nemátocidas). Libro I. Tercera edición. Departamento Editorial. Universidad de Guadalajara. Pág. 96.
- 85.- Singer, M. y Berg, P. 1993. Genes y Genomas. Ediciones Omega. Barcelona. pp. 3-8.
- 86.- Steene, F. V. 1992. Chemical control of *Delia radicum* L. by treatment before planting. *Mededelingen Van de Faculteitt Landbouwwetenschappen, Universiteit Gent*. 57 (1): 35-43. (Abs.).

- 87.- Steinkellner, H. et al 1998. Genotoxic effects on Heavy Metals: Comparative Investigation with plant bioassays. *Environmental and molecular Mutagenesis* 31: 183-191.
- 88.- Stevens, M.M. 1991. Insecticide treatments used Against a Rice Bloodworm, *Chironomus tepperi* (Diptera: Chironomidae): Toxicity and Residual Effects in Water. *Journal of Economic Entomology* 84 (3): 795-800.
- 89.- Tamarin, R.H. 1990. Principles of Genetics. Pws. Publishers. USA. Pag. 51-57.
- 90.- Tejada, A.W. et al 1990. Effect of processing on residues of chlorpyrifos in stored corn and rice. *Philippine agriculturalist*. 73 (3-4): 375-385. (Abs.).
- 91.- Thomson, W.T. 1992. Agricultural Chemicals. Book 1 Insecticides. Revision. Thomson publication. Fresno California. pp. 216-217.
- 92.- Toxic Chemicals in your Environment (TCYE), 2000. A community based program of total Environment Centre. Australian.
- 93.- Villee, A.C. 1994. *Biología*. 7ª. edición. Editorial Interamericana. México. pp. 42-52.
- 94.- Wallace, R.A. et al 1991. *Biología molecular y herencia*. Editorial Trillas. México. pp. 293-309.
- 95.- Wang, H. 1999. Clastogenicity of chromium contaminated soil samples evaluated by *Vicia* root-micronucleus assay. *Mutation Research* 426: 147-149.
- 96.- Wang, S. and Wang, X. 1999. The *Tradescantia*-micronucleus test on the genotoxicity of UV- B radiation. *Mutation Research* 426: 151-153.
- 97.- Wilson, R.G. y Hein, G.L. 1991. Effect of herbicides and insecticides applied to sugarbeet at planting. *Journal of Sugarbeet Research*. 28 (3-4): 115 - 128.
- 98.- Yang, G., 1999. *Tradescantia*-micronucleus assays on the water quality of lake Hongzhe in Jiangsu Province, China. *Mutation Research* 426: 155-157.
- 99.- Zhang, Y. y Xiao, H. 1998. Antagonistic effect of calcium, zinc and selenium against cadmium induced chromosomal aberrations and micronuclei in root cells of *Hordeum vulgare*. *Mutation Research* 420: 1-6.

9.- APENDICE

CUADRO A. PRUEBA DE TUKEY-KRAMER PARA LA FRECUENCIA DE MICRONUCLEOS.

COMPARACION	SIGNIFICANCIA
Testigo vs dosis 0.5	*** P < 0.001
Testigo vs dosis 2.0	*** P < 0.001
Testigo vs dosis 3.0	*** P < 0.001
Testigo vs dosis 4.0	*** P < 0.001
Testigo vs dosis 5.0	*** P < 0.001
Dosis 0.5 vs dosis 2.0	*** P < 0.001
Dosis 0.5 vs dosis 3.0	ns P > 0.05
Dosis 0.5 vs dosis 4.0	ns P > 0.05
Dosis 0.5 vs dosis 5.0	*** P < 0.001
Dosis 2.0 vs dosis 3.0	*** P < 0.001
Dosis 2.0 vs dosis 4.0	** P < 0.01
Dosis 2.0 vs dosis 5.0	*** P < 0.001
Dosis 3.0 vs dosis 4.0	ns P > 0.05
Dosis 3.0 vs dosis 5.0	** P < 0.01
Dosis 4.0 vs dosis 5.0	*** P < 0.001

CUADRO B. PRUEBA DE TUKEY-KRAMER PARA EL INDICE MITOTICO (IM).

COMPARACION	SIGNIFICANCIA
Testigo vs dosis 0.5	*** P < 0.001
Testigo vs dosis 2.0	*** P < 0.001
Testigo vs dosis 3.0	*** P < 0.001
Testigo vs dosis 4.0	* P < 0.05
Testigo vs dosis 5.0	* P < 0.05
Dosis 0.5 vs dosis 2.0	ns P > 0.05
Dosis 0.5 vs dosis 3.0	ns P > 0.05
Dosis 0.5 vs dosis 4.0	ns P > 0.05
Dosis 0.5 vs dosis 5.0	*** P < 0.001
Dosis 2.0 vs dosis 3.0	ns P > 0.05
Dosis 2.0 vs dosis 4.0	ns P > 0.05
Dosis 2.0 vs dosis 5.0	*** P < 0.001
Dosis 3.0 vs dosis 4.0	** P < 0.01
Dosis 3.0 vs dosis 5.0	*** P < 0.001
Dosis 4.0 vs dosis 5.0	*** P < 0.001