

P-222

UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA

Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias

MAESTRIA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS



**PRUEBA DEL COMETA ALCALINO
EN NUCLEOS DE CELULAS DE
Agave tequilana Weber CON MARCHITEZ.
EVALUACION DE DAÑO GENETICO.**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

P R E S E N T A
ARMANDO AREVALO HERNANDEZ

DIRECTOR DE TESIS:

DR. CARLOS ALVAREZ MOYA

A S E S O R E S :

DRA. ANNE SANTERRE DE AREVALO

M. EN C. RAFAEL SOLTERO QUINTANAR

LAS AGUJAS, ZAPOPAN, JAL. OCTUBRE DE 1999



UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA
CENTRO UNIVERSITARIO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y AGROPECUARIAS
DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y AMBIENTALES

COORDINACION DEL POSGRADO EN CIENCIAS BIOLOGICAS

DR. MARCELINO VAZQUEZ GARCIA
COORDINADOR DEL POSGRADO DEL CENTRO UNIVERSITARIO
DE CIENCIAS BIOLOGICAS Y AGROPECUARIAS
P R E S E N T E

Por medio de la presente informo a Usted que el **Biol. ARMANDO AREVALO HERNANDEZ**, estudiante de la Maestría en Ciencias Biológicas, con la tesis intitulada: **“PRUEBA DEL COMETA ALCALINO EN NÚCLEOS DE CÉLULAS DE Agave Tequilana Weber CON MARCHITEZ EVALUACIÓN D DAÑO GENÉTICO”**, reunió todos los requisitos para que se lleve a cabo su impresión. Así mismo, hemos acordado que, a propuesta del Comité Académico del Posgrado en Ciencias Biológicas, se designe a los siguientes profesores como miembros del jurado del examen de grado correspondiente:

Dr. Carlos Alvarez Moya	Presidente
Dra. Galina Zaitseva Petrovna	Secretario
Dra. Anne Santerre Lucas	1er. vocal
Dr. Guillermo Zuñiga	2do. Vocal
M. C. María Cruz Arriaga Ruiz	3er. vocal

Mismo que se verificará el 18 de Octubre del presente año a las 11:00 horas. En la sala de tesis de la División de Ciencias Biológicas y Ambientales, de este Centro Universitario.

ATENTAMENTE
“PIENSA Y TRABAJA”
Las Agujas, Zapopan, Jal. 5 de Octubre de 1999


DR. EULOGIO PIMIENTA BARRIOS
COORDINADOR DEL POSGRADO EN CIENCIAS BIOLOGICAS

*Recibo
Dra. Cruz
06/10/99*

DR. EULOGIO PIMIENTA BARRIOS
COORDINADOR DEL POSGRADO
EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
CENTRO UNIVERSITARIO DE CIENCIAS
BIOLÓGICAS Y AGROPECUARIAS.
P R E S E N T E

Por este conducto, nos permitimos informar a usted, que habiendo revisado el trabajo de tesis realizado por el C. Armando Arévalo Hernández, con el título: **PRUEBA DEL COMETA ALCALINO EN NÚCLEOS DE CÉLULAS DE *Agave tequilana* Weber CON MARCHITEZ. EVALUACIÓN DE DAÑO GENÉTICO.**

consideramos que ha quedado debidamente concluida, por lo que ponemos a su disposición el escrito final para autorización de impresión y programación de fecha de examen de grado.

Sin otro particular, agradecemos de antemano la atención que se sirva brindar a la presente y aprovechamos la ocasión para enviarle un cordial saludo.

A T E N T A M E N T E
Zapopan, Jal. 18 de septiembre de 1999

~~Dr. CARLOS ALVAREZ MOYA~~
DIRECTOR DE TESIS

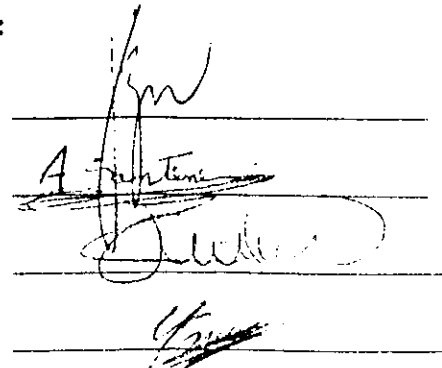
COMITÉ TUTORIAL:

Dra. Galina Zaitseva Petrovna

Dra. Anne Santerre Lucas

Dr. Guillermo Zúñiga

M en C. Mari Cruz Arriaga



Recibido
28/09/99
93/0

CUCBA



BIBLIOTECA CENTRAL

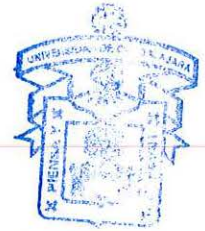
INDICE GENERAL

INDICE GENERAL

Indice general	i
Resumen	iv
Abstrac	v
Dedicatoria	vi
Agradecimientos	vii
Introducción	1
Antecedentes	3
<i>Agave tequilana Weber</i>	3
Metabolismo del Agave	5
Embriogénesis Somática	10
Agentes Químicos y Físicos con	
Actividad Genotóxica:	12
Farmaceuticas	12
Plaguicidas	13
Emisiones Gaseosas y Partículas	13
Rayos X	14
Rayos Ultravioletas	15
Ultrasonido	15
Fluorescencia	16
Bioensayos Genéticos	16

Ensayos en Microorganismos	17
Ensayos en células de mamíferos	18
Ensayos en insectos	18
Ensayos en plantas	19
Otros bioensayos	20
Prueba del cometa	21
Planteamiento del Problema	23
Hipótesis	24
Objetivos	25
Materiales y Métodos	26
Sustancias Químicas utilizadas	26
Obtención y tratamiento de <i>Agave</i>	
<i>Tequilana Weber</i>	26
Obtención de núcleos	27
Ensayo del Cometa Alcalino	27
Resultados	29
Discusión	30
Cuadro	32
Conclusiones	33

CUCBA



BIBLIOTECA CENTRAL

Figuras	34
Bibliografía	43

AGRADECIMIENTOS



BIBLIOTECA CENTRAL

AGRADECIMIENTOS

Agradezco primeramente al creador, que es el dador de todo cuanto existe en el universo, sin él, nada ni nadie hubiera tenido un principio, mucho menos una renovación y un bendito fin.

Quiero agradecer a mis padres que me dieron la vida (Bernardino Vázquez Orozco y Juana Arévalo Briones, q.d.e.p); también con especial cariño a mis padres que me crearon (Manuel Arévalo Briones y María Hernández Hurtado), sin ellos no hubiera podido llegar a donde ahora estoy.

A mi Esposa Silvia, sin su apoyo, no hubiera podido dar un avance en mi desarrollo científico, y a mis dos hijos (Itzcóatl y Tlacaélel), que han sido fuente de inspiración para mi superación; con la idea de que cuando crezcan busquen la superación, intelectual, material y espiritual.

A Lic Pedro Vargas Ávalos, que me ha venido apoyando en mi desarrollo social-político, periodístico, etc.. En definitiva, ha sido buena suerte estar bajo su sombra, a pesar de tantos regaños, y enojos.

Al Ing. Cuahutémoc Muñoz Morante, quien me ha apoyado como si fuera un hijo.

Al Sr. Enrique Ricardo Díaz Cepeda, por sus sabios consejos.

A mis amigos de maestría y de aventuras: M en C. Juan Roa Vidal, M en C. Luis Guerrero Quiroz; ellos me ayudaron, alentaron, y regañaron, cuando fue necesario.

De forma especial quiero agradecer al Dr. Carlos Álvarez Moya, por su apoyo, sus consejos, sus regaños, y su dedicación en mi formación científica.

También quiero agradecer a las siguientes personalidades, que han influido en mi desarrollo intelectual y espiritual: Lic. Cuahutémoc Cisneros Lamadrid, Dr. Enrique Estrada Faudón, Prof. José Muro Ríos, Profesora Luz María Villareal de Puga, Sr. Manuel Villagómez Rodríguez, Lic. Juan Solórzano Anguiano, Sra. Ma. Socorro Romero viuda de Velarde, Dr. Benito Arévalo Hernández, Ing. José Vázquez Arévalo, Ing. José Luis Arévalo Hernández, Víctor y Julio Macías Valladares, Dr. Jesús Rodríguez Gurrola, Prof. Armando Soto e hijos, Sra. Paulina Carvajal de Barragán, Prof. Jorge Munguía Martínez, Prof. Raúl Sánchez Robles, Sra. Laura Fregoso N, M en C. Mercedes Limón S, Biol. Rosario Huizar; a la Comunidad Franciscana de Zapopan, en especial a Fray Maseo, Fray Gerardo González, Padre Maxi, etc. y no podían faltar la orden Jesuita, empezando con el Padre Chuchín, entre otros.

RESUMEN

RESUMEN

La prueba del cometa es una excelente herramienta para evaluar daño genético inducido por sustancias químicas, sin embargo, salvo un estudio, ésta ha sido exclusivamente utilizada en células animales. En este trabajo, se empleó la prueba del cometa alcalino con el propósito de detectar la presencia de lesiones en el material genético de plantas de *Agave tequilana Weber*. Para ello, se diseñó una metodología simple para la obtención de los núcleos. Tres grupos de plantas fueron estudiados: (a) plantas enfermas con marchitez del agave obtenidas directamente de los cultivos, (b) plantulas sanas obtenidas por embriogénesis somática y (c) plantulas sanas expuestas, por separado, a un mutágeno conocido: Etil metanosulfonato (EMS) y a un herbicida: glifosato, el cual, es aplicado extensamente en los cultivos de agave. Todos los grupos de plantas, incluyendo las enfermas, presentaron una diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.0001$), respecto a la longitud de la cola del ADN cuando se compararon con las plantas sanas, lo que sugiere presencia de daño genético. Los resultados indican que la prueba del cometa puede ser utilizada para diagnosticar daño genético en cualquier tipo de planta no utilizadas tradicionalmente como biomonitores de genotoxicidad.

ABSTRAC

ABSTRACT

The comet assay is a valuable tool to assess for genetic damage induced by chemicals. However, except for one report, this test has been used in animal cells only. In this study, the alkaline comet assay was used in order to detect the presence of damages in genetic material of *Agave tequilana* Weber plants. To do this, a simple methodology was designed to obtain the nuclei. Three groups of plants were studied: (a) diseased plants directly taken from crops; (b) healthy plants taken by somatic embryogenesis; and (c) healthy plants exposed separately to one well known mutagen, namely ethyl methane sulfonate and to glyphosate, a herbicide. Glyphosate is widely applied to agave crops. All plant groups, including the sick plants, showed a statistically significant difference ($p < 0.0001$) in respect to the tail length, when compared to healthy plants. The results indicate that the comet assay may be used to test to probe genetic damage in any kind of plants not traditionally used as genotoxicity biomarkers.

DEDICATORIA

CUCBA



BIBLIOTECA CENTRAL

DEDICATORIA

A mis familias:

Fam: Arévalo Torres (Silvia, Itzcóatl, y Tlacaeletl).

Fam: Arévalo Hernández (a mis papás y hermanos de crianza)

Fam: Vázquez Arévalo (hermanos de sangre)

Fam. Torres López (Sra. Evangelina y Sr. David e hijos)

A su Santidad:

Juan Pablo II, quien ha actualizado a la iglesia en el conocimiento científico contemporáneo.

A sus Eminencias:

Juan Sandoval Iñiguez.

Adolfo Hernández Hurtado

¡ A las víctimas de Acteal, Chiapas, para que no se vuelva a repetir !

INTRODUCCION

INTRODUCCION

La información genética para el desempeño de todas las funciones vitales de un ser vivo está codificada en los genes, los cuales, pueden sufrir modificaciones debido a la influencia de agentes físicos y químicos. Estas modificaciones o mutaciones conducen a la formación de productos génicos alterados que pueden causar anormalidades genéticas en los seres vivos.

Muchas de las sustancias encontradas en la naturaleza o producidas por el hombre son capaces de producir mutaciones. Actualmente, existen aproximadamente 5 millones de sustancias diferentes y una gran parte están en contacto con los seres vivos incluyendo el hombre. En adición a los agentes químicos, los agentes físicos como las radiaciones contribuyen a aumentar el riesgo genético. Uno de los grupos de sustancias químicas que representan mayor riesgo desde el punto de vista genético, son los pesticidas, muchos de ellos han mostrado actividad mutagénica y carcinogénica. Algunos han sido prohibidos mientras que a otros se les considera de poco riesgo: el glifosato, por ejemplo.

La planta *Agave tequilana* Weber posee enorme importancia para el estado de Jalisco y en general para México. A últimas fechas, los cultivos de esta planta se han visto atacados por una enfermedad denominada "Marchitez del Agave" cuya etiología no está bien determinada. Existe la posibilidad de que la enfermedad esté vinculada con el desmedido uso de pesticidas. Otras líneas de investigación atribuyen la enfermedad a la acción de hongos, bacterias, etc.

En este trabajo se evaluó la presencia de daños genéticos en las células de *Agave tequilana* Weber enfermas, y en plantas sanas expuestas a diversas sustancias químicas.

Para la evaluación de daño genético se utilizó la prueba llamada "*Ensayo del Cometa Alcalino*" o "*Prueba del Cometa*", hubo que desarrollar y estandarizar la metodología para llevarla a cabo. Los resultados revelaron la presencia de ADN dañado en las células de plantas enfermas y en las expuestas a glifosato y al mutágeno EMS (etil metano sulfonato).

ANTECEDENTES

ANTECEDENTES

Agave tequilana Weber

Esta planta forma parte de la familia Agavaceae, endémica de América y distribuida en el sur de Canadá, México, Centroamérica, en el norte de Sudamérica y en algunas islas del Caribe (García y Galván, 1995). Esta familia ha tenido constantes cambios en su clasificación, y algunos autores consideran sus miembros en otras familias, como las liliáceas y las amarilidáceas (García y Galvan, 1995). Estudios recientes acerca de su origen y parentesco con otras plantas concuerdan en que la familia agaváceas puede estar representada por dos subfamilias: las yucas (Cucchoideae) y los agaves (Agavoideae) (García y Galvan, 1995)

En Jalisco, se reconoce al *Agave tequilana* Weber como "el mezcal tequilero", debido a la importancia de la planta para su uso en la obtención de la bebida nacional: el tequila.

Los agaves de Jalisco presentan una gran variedad, y su uso es muy variado, así tenemos el *Agave salmiana*, *Agave americana* var. *Americana* y el *Agave hookeri*, para la obtención de agua miel, además de que sus pencas pueden ser utilizadas para la cocción de la barbacoa (Valenzuela, 1998).

Del *Agave angustifolia* en sus diferentes formas, se puede obtener mezcal, mientras que del *Agave inaequidens* se obtiene una bebida que se conoce como raicilla (Valenzuela, 1998).

La palabra agave significa en latín "admirable" y fue a partir del *Agave americana* que el botánico Carlos Linneo, describió el género en 1753.

El género agaveideae se divide en los subgéneros: Agave, con inflorescencia y panícula o umbelada, y Littae, en forma de espiga o racimosa (Valenzuela, 1998)

El *Agave tequilana* Weber, es una planta surculosa que extiende radialmente de 2.2 a 2.8 metros sus hojas. Su tallo es grueso, corto de 30 a 50 centímetros son lanceoladas, acuminadas y de fibras firmes, casi siempre rígidamente estiradas, cóncavas de ascendentes a horizontales. Lo más ancho de las hojas se encuentra hacia la mitad y son angostas y gruesas hacia la base, generalmente de color glauco azulado o verde grisáceo. El margen de las hojas es recto a ondulado o reptando; los dientes generalmente son de tamaño regular y espaciados irregularmente, en su mayoría de tres a seis milímetros de largo a la mitad de la hoja. Los ápices de los dientes son delgados, curvos o flexos desde poca altura de la base piramidal (Valenzuela, 1998).

Los dientes son de color café claro a oscuro, de uno a dos centímetros de separación, raramente son remotos o largos. La espina generalmente es corta de uno a dos centímetros de largo, raramente es larga achatada o abiertamente surcada de arriba. Su base es ancha, café oscura decurrente o no decurrente. La inflorescencia es una panícula de cinco a seis metros de altura y densamente ramosa a lo largo con 20 a 25 umbelas largas difusas de flores verdes y estambres rosados. Las flores son de 68 a 78 milímetros de largo con bracteolas sobre los pedicelos de tres a ocho milímetros de longitud. El ovario es de 32 a 38 mm de largo, cilíndrico con cuello corto, inconstricto, casi terminado en punta sobre la base. El tubo floral es de diez milímetros de ancho, funiforme y surcado. Los sépalos son desiguales de 25 a 28 milímetros de longitud por 4 milímetros de ancho, lineares, erectos pero rápidamente flojos en la antesis, cambiando entonces a cafosos y secos. Los filamentos miden de 45 a 50 milímetros de largo doblados hacia adentro junto al pistilo, insertos de siete a cinco milímetros cerca de la base del tubo; las anteras son de 25 milímetros de largo. El fruto es una cápsula ovada o brevemente cuspidada (Figura 1).

El *Agave tequilana* Weber, tiene como características primordiales o distintivas: intenso color azul de sus hojas, lo prolífico en hijuelos de rizomas y, sobre todo, sus magníficas cualidades para la elaboración de tequila.

El *Agave angustifolia*, es más parecido al *Agave tequilana* Weber. Se diferencia en que la cabeza del primero es más pequeña y de forma redondeada (Valenzuela, 1998).

Metabolismo del Agave

La mayoría de las plantas fijan el bióxido de carbono durante la fotosíntesis en presencia de luz solar. Bajo estas condiciones, los estomas se encuentran abiertos y presentan grandes pérdidas de humedad. Algunas plantas que evolucionaron en condiciones de poca humedad modificaron su metabolismo con la finalidad de ahorrar agua. Así, los estomas: orificios

microscópicos de las hojas, sólo se abrirían con la oscuridad para tomar el bióxido de carbono y se cierran durante el día. Este tipo de metabolismo se encontró por primera vez en plantas de la familia de las Crassuláceae y se llamó metabolismo ácido crasuláceo y las plantas que lo presentan se les denomina CAM (crasuláceae ácido metabólico). Los agaves, nopales y otros tipos de plantas, realizan este tipo de metabolismo, guardan el bióxido de carbono fijado en la oscuridad en forma de ácidos orgánicos, por lo que experimentan un aumento en la acidez de sus tejidos durante la noche. Según evidencia reciente, este metabolismo es un mecanismo de adaptación que facilita la fotosíntesis en zonas áridas. Lo anterior se observó de *Agave tequilana Weber* (Novel y Valenzuela, 1987). Estos mismos autores constataron que el *Agave tequilana Weber* es una planta tipo CAM. Dicho patrón es referido al intercambio de vapor de agua y bióxido de carbono durante las 24 horas del día, y se incrementa durante la noche, como se espera en una planta tipo CAM.

Las condiciones del clima y del ambiente en general afectan las funciones de las plantas. La ecofisiología estudia el funcionamiento de las plantas y la forma en que el ambiente lo afecta. Para conocer el efecto de la humedad, la temperatura y la radiación solar, necesaria en la fotosíntesis de *Agave tequilana Weber*, se estudió durante un año su crecimiento en campo y su desarrollo en cámaras de crecimiento bajo condiciones controladas de laboratorio (Novel y Valenzuela, 1987). Los resultados indican que durante los meses de junio a noviembre las condiciones de humedad en la región de Tequila, fueron favorables para el cultivo. Esto concuerda con el período de lluvias en la región y con el almacenamiento de humedad en el suelo. En cuanto a la temperatura, éste fue un factor igualmente aceptable durante casi todos los meses. Sin embargo, las altas temperaturas presentes de mayo a junio y las bajas de diciembre a enero originaron una reducción en la productividad de la planta.

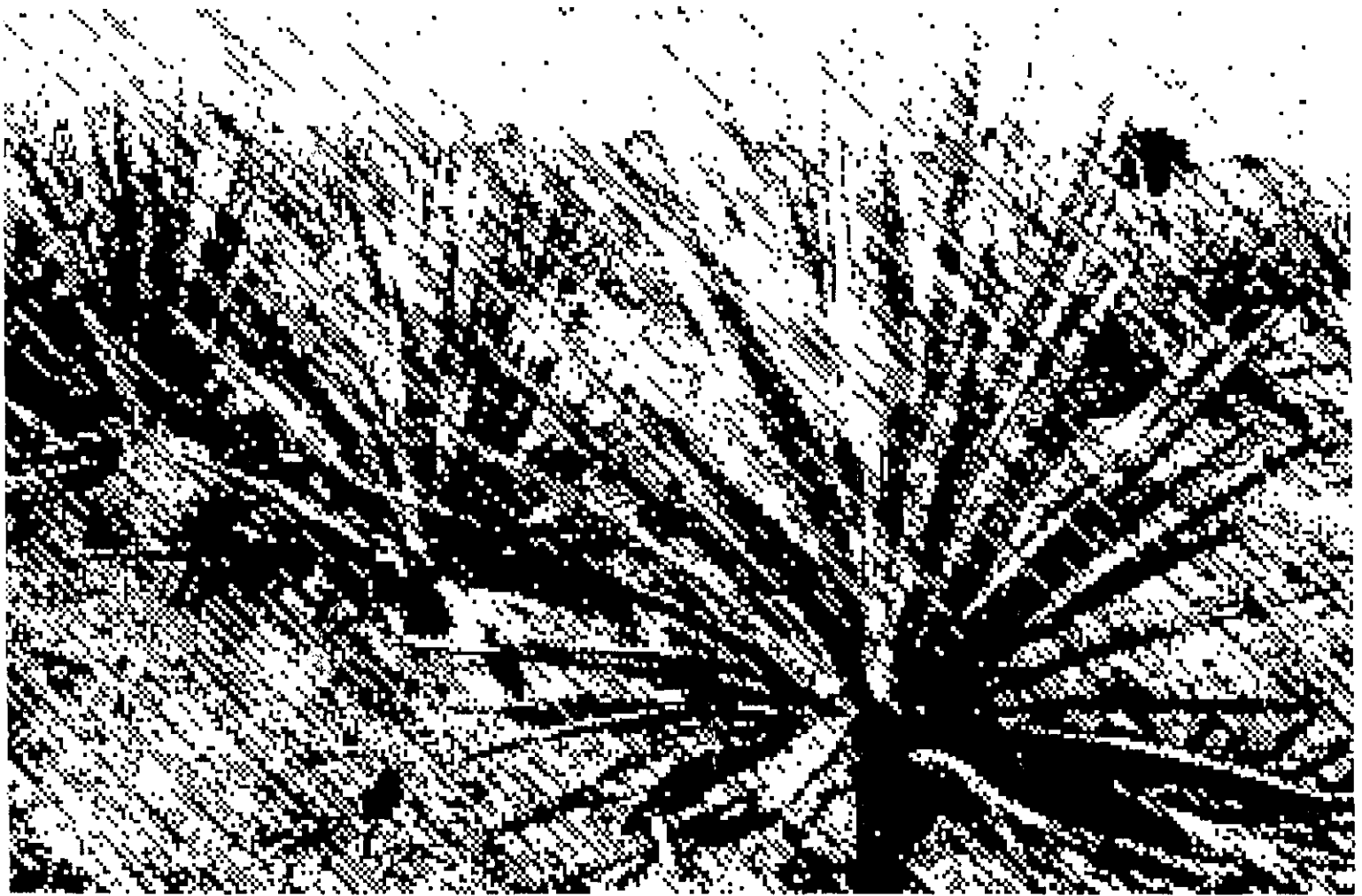
El Agave tequilero, se propaga por vía sexual en forma de semillas, pero también por hijuelos, por rizomas y por bulbillos: pequeños hijuelos de la inflorescencia o quiote. Las dos últimas vías son asexuales.

La vía sexual, o sea por semillas verdaderas, no es utilizada comúnmente, pues suprime la floración del cultivo. Las semillas tienen bajo porcentaje de germinación, su crecimiento es lento y las plántulas resultantes son muy heterogéneas para ser utilizadas en el cultivo.

Los hijuelos de rizomas, son usados comúnmente para el establecimiento de poblaciones. Ésta ha sido la única forma de propagación que se ha venido practicando durante mucho tiempo (más de doscientos años). La ventaja de esta forma de propagación es la rapidez y cantidad con que se obtienen las plántulas. Los bulbillos son hijuelos pequeños que emergen en el quiote, junto con las flores no fecundadas que caen posteriormente sin formar frutos. Estos hijuelos no se utilizan en la propagación de material vegetativo para plantación. Valenzuela, 1998; utilizó dos métodos para inducir la producción de bulbillos en el agave azul: con el corte de botones florales y con la eliminación de anteras, comparó a ambos con una planta testigo o control. Sus resultados fueron una mayor producción de bulbillos con los tratamientos de inducción: 150% de hijuelos en el primero y 58% más en el segundo y además el tamaño de los bulbillos de los tratamientos de inducción fue mayor. Nueve meses después de la floración, las plantas inducidas a la producción de bulbillos formaron plantitas de 14 centímetros de longitud y hasta 2.5 centímetros de diámetro de cabeza.

La investigación sobre la micropropagación de agave ha proliferado en numerosos trabajos con objetivos variados. Por citar un ejemplo, durante el período de escasez de agave, en los años ochenta, se ofreció este camino como una propagación masiva, pero los costos la eliminaron como alternativa viable.

En la actualidad se propone la micropropagación como un medio para el mejoramiento genético (Rendón, 1991).



Embriogénesis somática

La embriogénesis somática puede ser producida indirectamente en cultivos de células o en tejidos desorganizados. La verdadera embriogénesis indirecta requiere la diferenciación celular a partir de células no diferenciadas extraídas de un callo, para así, poder tener cierta certeza de que las células podrán seguir el camino de la embriogénesis.

La embriogénesis somática tiene un origen necesariamente celular, se ha discutido sobre sí su origen viene de células no diferenciadas o de las diferenciadas, de cultivos desorganizados u organizados. Por otra parte la ontogénesis (desarrollo anatómico del embrión) ha sido estudiada en detalle en diferentes especies , por ejemplo: el embrión puede ser distinguido a partir de un retoño fortuito por ser bipolar, teniendo ambos un brote vegetativo y una raíz con una venación similar a el embrión zigótico. También pueden no tener conexión vascular con el tejido parental en cambio un brote puede inducir la formación de los tejidos de conducción procambial en el tejido materno. En la embriogénesis somática siempre se presenta enraizamiento superficial (Normura. Et al., 1990)

Es generalmente reconocido que la embriogénesis somática está formada a partir de células, las cuales, son característicamente meristemáticas, dando entonces diferentes células paranquimatosas encontradas en el callo o la suspensión del cultivo. Estas tienen un citoplasma denso, un núcleo grande y muchos granos o vacuolas con almidón

Ha sido claramente mostrado que la embriogénesis somática se puede iniciar a partir de una célula individual; directamente sobre un tejido de callo, suspensión celular, o a partir de protoblastos (Hepler et al., 1985); y a partir de células mecánicamente aisladas (Normura, et al., 1990).

Un cambio en el plano regular de la división celular es uno de los primeros indicios de que una formación embriogenética se está dando en el tejido o cultivo (Hepler et al., 1985). Donde la embriogénesis se origina a partir de una célula individual, una división desigual periclinal resulta en un pequeño enriquecimiento citoplasmático (en la célula terminal) y una vacuola larga en otras células (suspensoras). En algunos cultivos, las células basales no se dividen posteriormente, pero en ciertas circunstancias pueden llegar a ser células potencialmente originarias.

Agentes químicos y físicos con actividad genotóxica

El desarrollo de las sociedades modernas se acompaña ineludiblemente, con el uso de una gran cantidad de compuestos químicos. Existen más de 5 millones de sustancias y se desconocen los efectos de muchas de ellas (Grimler, 1983).

Se ha calculado que un ser humano común puede estar expuesto, de manera cotidiana, a un promedio de 35,000 agentes químicos diferentes, gran parte de ellos figuran como ingredientes de mezclas, polvos, etc.. y muchos han sido descritos como mutagénicos (Heflich, 1991)

Existen varios grupos de sustancias potencialmente peligrosas desde el punto de vista genético, por mencionar sólo algunas:

Farmacéuticas

No se puede negar la importancia de los productos farmacéuticos para el tratamiento de enfermedades, no obstante, en los últimos años se ha dado una atención especial a los peligros de la medicación. Ciertos tipos de medicamentos o su administración simultánea así como la automedicamentación dan lugar a consecuencias inesperadas (Ishidate, Harnois, Sofini, 1988)

Se sabe que algunos fármacos y hormonas pueden producir cáncer (Higginson 1975, Hoover y Fraumeni 1975).

Plaguicidas

Los plaguicidas son ampliamente utilizados en todo el mundo a pesar de que muchos de ellos han provocado daños ecológicos sin precedentes (DDT, Aldrín, Dieldrín) debido principalmente a su baja tasa de biodegradabilidad. Aunque estos compuestos han sido ya prohibidos, muchos otros continúan en uso. Prácticamente ningún país escapa a la problemática generada por los pesticidas: el 1,2 dibromo-3-cloropropano, insecticida organoclorado, se ha detectado como contaminante en pozos de agua en el área metropolitana de Fresno, California (Grella et al. 1994, Zou et al. 1995, Kloos 1996). México tampoco es ajeno a este tipo de problemas y algunos estudios recientes los ejemplifican: plaguicidas organoclorados se detectaron en aguas de riego en el Valle de Mexicali (Carrillo-Cedillo y Vélez 1996). Varios tipos de pesticidas fueron encontrados en camarón capturado en granjas acuícolas del centro de Sinaloa y en el puerto de San Blas, Nayarit (Ramírez et al. 1996), otros plaguicidas organoclorados se encuentran como contaminantes en leche materna de mujeres que habitan en zonas cercanas a Veracruz (Waliszewski et al. 1996). Los efectos directos de los plaguicidas en el hombre comprenden daños que van desde simples irritaciones epidérmicas hasta envenenamientos, mutaciones genéticas, cáncer y finalmente la muerte (Gómez -- Arroyo 1992^a, Moses 1992).

Emisiones gaseosas y partículas

Estas sustancias contienen (hidrocarburos, monóxidos, y bióxidos de carbono, por mencionar algunas), son el producto de la combustión y de la actividad industrial y automovilística. Se ha demostrado daño genético inducido por hidrocarburos aromáticos policíclicos en *Drosophila melanogaster* (Frölich y Würigler, 1990). Los productos de combustión diesel

y las partículas suspendidas en el aire, también mostraron capacidad mutagénica en bacterias (Atherholt et al. 1984, Crebelli et al. 1995, Villalobos Pietreni et al. 1994). La interacción química de estas sustancias en la atmósfera tiene efectos perjudiciales para la salud, el cáncer es uno de ellos (Frölich, Würgler, 1990)

Hasta la fecha, existe evidencia de que 2,800 sustancias industriales (IARC 1987) son carcinogénicas para el hombre. En su mayoría se trata de carcinógenos ocupacionales o bien dispersos en el ambiente, así como fármacos empleados en la quimioterapia del cáncer, que paradójicamente (salvo en algunos casos donde no se ha logrado reproducir el modelo de exposición humana) son capaces de inducir cáncer en animales de experimentación (Shelby, 1988). Es importante hacer notar que la concentración presente de las sustancias contaminantes en cada región depende de las características socioeconómicas que en ella prevalecen.

Aunque no cabe duda que muchas sustancias acarrearán beneficios a la humanidad, otras han provocado prejuicios severos. Un agente químico ingresa al medio y después, a través de diversas vías, penetra a un organismo vivo, tal es el caso de los fertilizantes, los plaguicidas y los herbicidas que son aplicados directamente al ambiente (Gómez- Arroyo et al. 1992b, Moses 1992), otros como los óxidos de azufre, de nitrógeno, el plomo y los hidrocarburos aromáticos policíclicos aparecen en los procesos de combustión (Molina 1990).

Rayos X

Entre los agentes físicos se tiene a los Rayos X, estos fueron descubiertos por Müller en 1927, desde entonces se ha acumulado información sobre la inducción de mutaciones génicas y variaciones estructurales por este agente físico. En este sentido, *Drosophila*

melanogaster constituye el modelo biológico usado con mayor frecuencia. Generalmente se irradian los machos con ciertas dosis. Las mutaciones producidas por irradiación son con frecuencia letales, mientras que las mutaciones con efecto fenotípico aparente son sólo la décima parte de las letales (Lindsley y Grell, 1968).

Rayos ultravioletas

Los rayos ultravioletas inducen mutaciones de tipo puntual y cromosómicas (Griggs y Bender, 1973 y Meltz 1991), pero tienen el inconveniente de que poseen muy poca penetración, por lo que se usan con más ventaja para irradiar bacterias, esporas de hongos o polen de plantas, como es el caso del maíz. Así gran cantidad de mutantes obtenidos en *Neurospora* y en diversas levaduras se han inducido por medio de radiación ultravioleta.

Ultrasonido

Las ondas ultrasónicas han resultado capaces de inducir mutaciones (Barnett, 1982, Ciaravino et al. 1986). Una frecuencia de 400,000 vibraciones por segundo produjo mutaciones letales en *Drosophila melanogaster* (Ciaravino et al. 1986). así como, variaciones estructurales en los cromosomas somáticos de varias plantas (Meltz, 1991).

Fluorescencia

La radiación fluorescente, es capaz de inducir formación de linfomas en células de ratón (Jacobson et al. 1978) sin embargo, existe muy poca información acerca de este tipo de radiación.

Bioensayos genéticos

Los estudios epidemiológicos pueden aportar evidencia respecto a que un agente induce mutaciones heredables en humanos, sin embargo, es difícil obtener tales datos debido a factores como: variabilidad genética humana, número reducido de hijos, tiempos prolongados entre las generaciones, etc. Además, los estudios epidemiológicos aportarán la información una vez que ha ocurrido el daño genético, por lo tanto, el sistema más adecuado para detectar actividad mutagénica será aquel que localice a los mutágenos antes que éstos manifiesten sus efectos en los seres humanos. Por lo anterior, resulta apropiado basarse en datos obtenidos en sistemas experimentales (bioensayos) sobre otros organismos, tanto procariotes como eucariotes, siempre que están expresadas claramente las limitaciones y las diferencias en el metabolismo y en los sistemas de reparación del ADN (Li y Loretz, 1991).

Otros autores opinan que tales diferencias no son tan evidentes y que los resultados pueden extrapolarse inclusive al hombre, de tal suerte que, este tipo de estudios han sido recomendados a la Organización Mundial de la Salud (Grant, et al. 1994).

Los bioensayos genéticos cumplen cabalmente con su papel de biomonitores al detectar la presencia de mutágenos (aunque no siempre resulten mutagénicos en el hombre), por ello, no es requisito indispensable

que los bioensayos se realicen en células humanas, sin embargo, pueden hacerse la comparación con un alto grado de certeza (Grant, et al. 1994).

En muchos países se ha establecido el requisito de ensayo (agudo o de corto plazo y crónico o de largo plazo), asimismo, se han fijado normas y niveles de tolerancia y se han desarrollado una serie de bioensayos de tiempos cortos para la observación de cambios genéticos (cromosómicos y génicos). Son varios los usos de estos bioensayos: 1 búsqueda de productos ambientales con actividad carcinogénica, 2 identificación de carcinógenos en fluidos del cuerpo, 3 entendimiento de los mecanismos de la activación química de carcinógenos y sus reacciones con el ADN, 4 predicción de la carcinogenicidad de sustancias, aunque su interpretación es difícil. Generalmente, para afirmar que una sustancia química es carcinogénica se requieren de dos o tres bioensayos (Casciano, 1991).

Ensayos en microorganismos

Los microorganismos han sido muy utilizados en genética toxicológica. El bioensayo de reversión de histidina en *Salmonella typhimurium* (Prueba de Ames) es usado ampliamente para correlacionar mutagenicidad y carcinogenicidad (Ames et al. 1973).

Entre los bioensayos más utilizados con microorganismos están: (a) reversión de histidina en *Escherichia coli*, (b) reversión de histidina en *Salmonella typhimurium*, (c) los ensayos en *Saccharomyces cerevisiae*, basados en la acumulación de pigmentos rojos. Las dos primeras son usadas para medir la dirección de la mutación que conduce a la reversión de las cepas especialmente construidas que requieren histidina. En cuanto al tercero, en *Saccharomyces cerevisiae*, las cepas ADE 1 y ADE 2 forman colonias blancas cuando hay poco suplemento de adenina, cuando estas

cepas mutan en los genes *ade 1* y *ade 2* la levadura forma colonias rojas (Li y Loretz 1991).

Ensayos en células de mamíferos.

Debido a las diferencias en la organización y complejidad del genoma, se han utilizado células animales para complementar los ensayos en microorganismos (Hsie et al. 1981, Heddle et al. 1983, Ishidate et al. 1988, Kelsey 1988, Torres Bugarín 1993, Graf 1984). Con células de mamíferos cultivadas, virtualmente todos los mecanismos de mutación pueden ser estudiados (mutación en un gen, aberraciones cromosómicas, intercambio de cromátidas hermanas, etc.).

La observación de cromosomas anormales es la forma más común para detectar mutaciones de tipo numérico y/o estructural (Kelsey 1988, Ishidate et al. 1988, Salamanca 1990).

Ensayos en insectos

La prueba de letales recesivos ligados al sexo (LRLS) en *Drosophila melanogaster*, es uno de los bioensayos más utilizados. En general los resultados que son positivos en esta prueba pueden ser considerados como válidos para la predicción de posible genotoxicidad en mamíferos (Graf et al. 1994). La prueba de LRLS se basa en la ausencia de machos silvestres en la F2 obtenidos después de que los progenitores fueron sometidos a un tratamiento. En este caso se utilizan hembras de la línea CIB (C= inversión cromosómica, I= letal recesivo, y B= marcador ojo en barra)(Graf et al. 1994)

Dado que tanto las células germinales como las somáticas de *Drosophila melanogaster* son apropiadas para evaluar la genotoxicidad, de manera general, ambas sirven para predecir el riesgo de genotoxicidad en mamíferos. Se han desarrollado una gran cantidad de sistemas en *Drosophila melanogaster* capaces de detectar la mutación y la recombinación somáticas (SMART) en diferentes órganos de la mosca (Graf 1994). SMART hace posible la observación de los resultados en los mismos individuos que se sometieron al tratamiento (Graf et al. 1984).

Ensayos en plantas

En la actualidad se emplean plantas para la evaluación y monitoreo de diversos agentes químicos. Estos sistemas de prueba son altamente sensibles y hacen posible la detección del daño mutagénico. Varias plantas tienen la capacidad inherente para utilizarse como sistemas múltiples de ensayo genético. Estas plantas han tenido un papel importante en la detección de nuevos mutágenos y en el desarrollo de técnicas que después se aplicaron a otros sistemas para el avance del conocimiento en mutagénesis (Grant, et al. 1994).

Son varias las plantas utilizadas como sistemas de ensayo genético, entre las cuales están *Allium cepa*, *Arabidopsis thaliana*, *Crepis capillares*, *Glycine max*, *Herdeum vulgare*, *Lycopersicon esculentum*, *Nicotiana*, *Pisum sativum*, *Zea mays*, *Vicia faba*, *Tradescantia* (Grant, et al. 1994).

El bioensayo en *Vicia faba* utiliza las raíces para observar aberraciones cromosómicas o intercambio de cromátidas hermanas (Taylor 1958, Gómez-Arroyo et al. 1989). Y los sistemas de prueba en *Tradescantia* en los siguientes clones 02, Ku27, 4430, Ku9, Ku20 y Ku2031 son de los más utilizados, ya que detectan mutaciones de tipo génico y cromosómico (Miracle y Miracle 1967, Underbrink et al. 1973, Ma 1981, Grant 1992,

Ichikawa 1992). Uno de ellos consiste en la lectura de pelos estaminales (Ichikawa, 1981), y el otro en el análisis de micronúcleos en tétradas (Sparrow et al. 1974). Debe mencionarse que estos vegetales son baratos y de fácil manejo.

Otros bioensayos

Las pruebas de micronúcleos en vivo detectan daño sobre los cromosomas mediante la identificación de fragmentos acéntricos y/o cromosomas resagados, que al quedar fuera del núcleo forman estas estructuras (Schmid 1975, Heddle et al. 1978). La técnica clásica de micronúcleos es ampliamente aceptada para el estudio en diferentes especies y tejidos (Hart y Hartley-Asp, 1983, Ma 1981, Villalobos-Pietrini et al. 1986). Por otra parte, con la finalidad de buscar un modelo ideal de micronúcleos se estudió la frecuencia de ellos en 35 especies de mamíferos (Zuñiga, Villalobos, Ramírez et al. 1996). Recientemente, una nuevo sistema llamado Prueba del Cometa Alcalino empieza a ser ampliamente utilizada, ya que, detecta directamente fragmentos de ADN corridos en un microgel de agarosa; entre mayor es la cauda se intuye mayor daño génico (Fairhaim et al. 1995).

Vicia faba y *Tradescantia* son de importancia para la aplicación del ensayo del cometa alcalino en plantas, siendo *Vicia faba* la primera planta en la que se aplicó el ensayo, posteriormente se aplicó a *Tradescantia* (Figura 2).

PRUEBA DEL COMETA

Para la detección de daño genético inducido por agentes químicos o físicos, gran cantidad de pruebas en animales y bacterias las cuales son utilizadas para este fin (Ames et al. 1973, Underbrink et al. 1973, Graf et al. 1984, Heflich 1991, Galli and Schiestl 1995). Con estas pruebas se determina el efecto genotóxico de un agente específico sobre un organismo de prueba y los resultados pueden ser extrapolados a otros organismos. El diseño de nuevos ensayos que permitan detectar daño genético en cualquier organismo en el que se sospeche la existencia de anomalías genéticas sería relevante.

En la última década Narendra et al. (1988) reportó una prueba llamada prueba del cometa, utilizada para detectar daño en el ADN de animales a partir de células individuales. Este sistema utiliza las células inmersas en un gel de agarosa, los cuales, después de ser lisadas son sometidas a electroforesis y la cauda se analiza en el microscopio de fluorescencia (Fairhaim et al. 1995). La prueba del cometa es ampliamente utilizada con diversos propósitos en células animales; linfocitos humanos (Betti et al. 1994; Henderson et al. 1998), células sanguíneas de peces (Pandrangi et al. 1995), células epiteliales (Martín et al. 1997), espermatozoides de ratón (Brinkworth et al. 1998), células cancerosas (Marples et al. 1998).

La prueba del cometa fue reportada por Koppen y Verschaeve (1996) en *Vicia faba*, una planta usada comúnmente como ensayo para la detección de lesiones en el ADN, sin embargo, la metodología presenta algunos pasos críticos.

El agave mexicano: *Agave tequilana* Weber es una planta endémica en México, a partir de ella se produce el tequila de ahí que tiene gran importancia económica (Valenzuela, 1998). Para combatir las plagas, los

agricultores han aplicado gran variedad y cantidad de pesticidas (datos de agricultores). Recientemente, la aparición de la enfermedad denominada "Marchitez del Agave" de etiología desconocida, obligó a los agricultores a emplear mayor cantidad y variedad de pesticidas: herbamine, glifosato (empleado en el 80% de los cultivos), bactrol, cercobil e incluso algunos pesticidas prohibidos por su mutagenicidad o carcinogenicidad que, en muchos casos, los agricultores han aplicado sin una adecuada asesoría técnica (datos no publicados). Respecto al glifosato existen en la literatura contradicciones respecto a su actividad mutagénica: algunas sugieren que posee actividad mutagénica y carcinogénica (Moses 1992; Rank et al. 1993), sin embargo, la organización Mundial de la Salud lo considera poco tóxico (IPCS 1998). Por lo anterior, es importante valorar el efecto del glifosato en las células de la planta. Por otra parte, en un esfuerzo por determinar la etiología de la "marchitez" se investigó, con la prueba del cometa, la existencia de daño genético en núcleos de células de *Agave tequilana* Weber sanas, enfermas y las expuestas directamente al glifosato.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La marchitez del agave es una enfermedad muy reciente que ha provocado grandes daños a los cultivos de esta planta. La etiología no está bien definida; algunos autores lo atribuyen a factores climáticos o del suelo, otros a hongos, bacterias, insectos etc. Una posibilidad adicional, basada en observaciones de los productores, atribuye la enfermedad al uso desmedido de pesticidas como el glifosato, los cuales, pudieran ocasionar daño genético y fisiológico ocasionando una mayor sensibilidad de la planta a organismos normalmente inocuos. Es posible que las plantas enfermas con marchitez tengan ADN dañado por el uso de los pesticidas, especialmente glifosato, el cual es el más usado.

HIPOTESIS

HIPOTESIS

En las células de *Agave tequilana* Weber con marchitez, así como en las células sanas expuestas a glifosato, existe ADN dañado que puede ser detectado por la prueba del cometa.

CUCBA



BIBLIOTECA CENTRAL

OBJETIVOS

OBJETIVOS

General

1. Evaluar la presencia de daño genético por la prueba del cometa en las células de *Agave tequilana Weber* con marchitez y expuestas a glifosato.

Particulares:

- 1.1. Diseñar y estandarizar la prueba del cometa en las células de *Agave tequilana Weber*.
- 1.2. Cuantificar la migración del ADN de núcleos sanos de *Agave tequilana Weber*.
- 1.3. Cuantificar la migración del ADN de núcleos sanos expuestos a glifosato.
- 1.4. Cuantificar la migración del ADN de núcleos de plantas con marchitez.
- 1.5. Establecer comparaciones de migración.
- 1.6. Plantear la relación exposición de glifosato, daño genotóxico y marchitez.

**MATERIALES
Y
METODOS**

MATERIALES Y METODOS

Sustancias químicas utilizadas

El etil metano sulfonato (EMS) fue obtenido de la marca Sigma, mientras que el glifosato (gli), fue obtenido de su forma comercial (FAENA), se obtuvo de Monsanto.

Obtención y tratamiento de muestras de *Agave tequilana* Weber

El tejido de estudio fue obtenido de sitios diferentes: (I) meristemos radiculares de plantas generadas por embriogénesis somática proporcionada por el laboratorio de biotecnología del CUCBA, Universidad de Guadalajara, (II) de la hipodermis (sólo en plantas con marchitez). Los meristemos estudiados fueron: (a) testigo negativo (sin tratamiento con sustancias químicas); (b) testigo positivo (tratados con EMS 5 mM); (c) plantas expuestas a glifosato 0.05 %. Para el glifosato y EMS se prepararon 5 ml de cada uno. La solución en agua se puso en contacto por 3 horas en el medio donde crecían las plántulas generadas por embriogénesis somática. Al final de este tiempo, los ápices fueron cortados y lavados 3 veces con agua destilada. La muestra de plantas enfermas obtenida de la región basal de la hoja, en el nivel de hipodermis (0.5 g) fue lavada con hipoclorito de sodio y enjuagada 3 veces con agua destilada. Todas las muestras fueron plasmolisadas a 4° C con fructosa al 13 % durante una hora y después con fructosa al 3 % una hora (Cocking, 1972).

Obtención de núcleos

Terminada la plasmólisis, los meristemas fueron colocados en diferentes morteros secos. 3 ml de bufer Honda (0.44 M sucrosa, Ficoll 2.5% tipo 400, dextrán T-40 5%, Tris-HCL 2.5 mM (pH 8.5), Mg Cl₂ 10 mM, β-mercaptoetanol 10 mM y Tritón X-100 al 2.5 %) fueron añadidos a cada muestra, .5 g.

Los núcleos fueron obtenidos al presionar verticalmente el tejido sobre el mortero. Enseguida, 3 ml de bufer honda fueron agregados a cada muestra. La muestra fue filtrada en una malla Mesh Nytal nylon cloth de 80 micras. Los núcleos fueron aislados del filtrado por centrifugación y el sobrenadante fue desechado. El "pellet" conteniendo los núcleos fue lavado 3 veces a 1000 rpm con solución salina fisiológica (NaCl 0.9%). El lavado es muy importante, de lo contrario, la lisis nuclear no es posible. Finalmente, los núcleos fueron resuspendidos en 200 µl de solución salina y guardados a -20°C hasta el momento de su uso.

Ensayo del Cometa Alcalino

La suspensión nuclear fue usada en la prueba del cometa alcalino como describieron Koppen and Verschaeve (1996). Los cubreobjetos fueron primero cubiertos con agarosa punto de fusión normal (NMP) al 1 %, se permitió que solidificara y luego se retiró, esta primera capa nos permite una mayor adherencia de las capas que siguen. Después de esto, se colocó 10 ml de agarosa al 0.6% de NMP en el portaobjetos. Enseguida, 10 ml de agarosa de punto de fusión bajo (LMP) al 0.5% fueron mezclados con 5 µl de la suspensión nuclear y la mezcla se colocó sobre la primera capa. Una

tercera capa de 10 ml de (LMP) al 0.5% fue añadida para cubrir la segunda capa.

Las laminillas con los núcleos fueron sumergidas en solución de lisis (NaCl 2.5 mM, Na₂ EDTA 10 mM, Tris-HCL 10 mM, sodio lauril sarcocinato al 1%, Tritón X-100 al 1% y DMSO al 10%, pH 10) por 24 horas a 4°C. Después de la lisis, las laminillas fueron colocadas en un sistema de electroforesis horizontal con solución bufer (de alto pH (NaOH 30 mM, Na₂ EDTA 1mM, pH 13) por 3 horas a 4°C. La electroforesis se llevó a cabo por 10 minutos, 200 mA a 9 volts y una vez terminada las laminillas se lavaron con agua destilada durante un minuto e inmediatamente teñidas con 0.5 ml de bromuro de etidio, marca sigma (con una dilución de 20 µl / 1 ml), por 15 minutos. Después, las laminillas fueron lavadas 2 veces con agua destilada y un cubreobjetos, se colocaron sobre el gel para su observación en el microscopio.

La observación de los "cometas" se realizó en un microscopio de fluorescencia marca Reicher con un filtro de excitación 515-560 nm. Fotomicrografías de los núcleos fueron tomadas a 40X usando una película de color ASA 400. La migración del ADN fue medida en micras con un ocular graduado del microscopio. La medición se hizo a partir del centro del núcleo hasta el final de la cauda.

Los datos fueron analizados con el software "Co Stat" aplicando el análisis en un solo sentido de varianza "one way analysis of varianza" (ANOVA) (Ma et al. 1994). La significancia estadística de las diferencias entre los grupos controles (positivo y negativo) y experimentales fue determinada.

RESULTADOS

Como se aprecia en las (figuras), los núcleos de *Agave tequilana* Weber fueron teñidos con orceína (Figura 3.a) y bromuro de etidio (Figura 3.b), posteriormente fueron aislados (Figura 3c) y sometidos a la prueba del cometa (Figura 3d .y 3e). Con bromuro de etidio la cauda de ADN es fácilmente observable y ello posibilita la medición de su longitud en micras, tal como se hace en el caso de células animales. La tabla I presenta la longitud en micras de la cauda de núcleos de muestras controles, tratados con glifosato y de las plantas enfermas con la "marchitez". La comparación de los datos en cada columna mostró una diferencia estadísticamente ($p < 0.001$), lo cual, demuestra las diferencias entre los grupos estudiados. Aunque sólo se esperaban diferencias, entre el control negativo y el positivo (EMS), los resultados también indican fuertes diferencias estadísticamente significativas entre el control negativo y el grupo de las plantas enfermas así como el de las expuestas al glifosato.

La diferencia estadística entre las células expuestas al glifosato y el control positivo es mínima, lo que demuestra que en ambas se dio daño genotóxico (tabla I). En el control negativo, el mayor número de núcleos mostraron una migración de 88-95 micras, el EMS de 150-200 micras, el glifosato de 150-170 y el grupo de plantas enfermas de 113-125 micras (Figura 4, gráficas a,b,c,d).

DISCUSSION

DISCUSION

La Prueba del cometa es una valiosa herramienta que permite evaluar el daño genético inducido por algún agente químico o físico; (Monteith and Vanstone, 1995; Pfuhler and Wolf 1996; Sram et al. 1998), sin embargo, ha sido utilizada exclusivamente en células animales (Betti et al. 1994; Fairhaim et al. 1995; Marples et al. 1998). Esta prueba fue reportada también por primera vez en células de *Vicia faba* (Koppen y Verschaeve 1996) pero su metodología posee algunos pasos críticos, especialmente, el aislamiento de núcleos. La metodología utilizada por nuestro grupo, aunque inicialmente basada en el trabajo de Koppen y Verschaeve es más simple: no es necesario separar los núcleos en un gradiente de densidad.

La mayoría de las pruebas de genotoxicidad han sido diseñadas para evaluar la actividad mutagénica de un determinado agente sobre un organismo de prueba. La prueba del cometa en *Vicia faba* se ha desarrollado en el mismo sentido, sin embargo, un aspecto se ha descuidado: evaluar el daño genético en organismos en los que se sospechen anomalías del ADN, el tipo de agente quedaría ubicado en segundo término. En este sentido, la prueba del cometa, por su naturaleza, permitiría, teóricamente, detectar lesiones en el ADN de cualquier ser vivo y no sólo en organismos de prueba (Koppen y Verschaeve 1996). Debido a lo anterior, determinar el estado del material genético de los cultivos de *Agave tequilana Weber* con "marchitez del Agave", enfermedad de etiología desconocida, es particularmente importante debido al uso de gran cantidad de herbicidas, sin asesoría técnica. Uno de los herbicidas más usado en los cultivos de agave es el glifosato, utilizado en el 80% de los cultivos. Respecto a este herbicida, la literatura es contradictoria: IPCS (1994) lo valida como muy poco tóxico y no genotóxico. Otros autores reportan cierta actividad genotóxica (Rank

et al. 1993) y carcinogénica (Moses 1992) del glifosato. Así las cosas, resultaba importante evaluar el efecto del glifosato directamente sobre las células de *Agave tequilana Weber* y, al mismo tiempo, indagar la presencia de daño genético en células de plantas enfermas. Para lograr este objetivo hubo que desarrollar una metodología simple para aislar los núcleos: esta funcionó adecuadamente. Aunque esperábamos encontrar lesiones en el ADN de las células expuestas al mutágeno reconocido EMS fue sorprendente encontrar daño genético en las células de plantas enfermas y las expuestas al glifosato. Si bien, existe diferencia estadística entre las células enfermas y las expuestas al glifosato ($p < 0.001$) ambos grupos son, también diferentes al control negativo ($p < 0.0001$). Aunque existe evidencia, no podemos afirmar que en los cultivos de *Agave tequilana Weber* enfermas, el ADN esté dañado por el efecto del glifosato ya que otros agentes químicos o físicos también podrían ocasionarlo.

Debido a que los nuevos cultivos de agave son desarrollados a partir de los hijuelos (reproducción asexual) los cultivos actuales son prácticamente los mismos de hace un siglo, ello podría hacer que una mutación en el ADN de *Agave tequilana Weber* ocurrida en un hijuelo, ocasionara una mayor sensibilidad a hongos y bacterias (*Erwinia* y *Fusarium*) normalmente presentes en la planta enferma con marchitez.

CUADRO

Cuadro

Cuadro 1. Longitud de los cometas en micras en los grupos de plantas estudiadas.

No. de células	Plántulas no tratadas o control	Plántulas tratadas con EMS al 5 mM	Plántulas tratadas con glifosato 0.05%	Plantas con la marchitez
1	95	150	200	113
2	90	138	150	125
3	75	175	160	125
4	75	175	170	113
5	75	138	150	138
6	73	175	150	
7	70	175	170	
8	73	163		
9	73	150		
10	88	125		
11	88	175		
12	88	175		
13	95	150		
14	97	175		
15	88			
16	95			
17	80			
18	95			
19	88			
20	100			
21	95			
22	88			
23	88			
24	95			
25	95			
26	95			
Media =	26	14	7	5
Desv. Estandar.	9.282	17.709	18.127	10.402

La comparación entre las columnas, arrojó diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.0001$).

CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

Existe evidencia de que la marchitez del agave pudiera deberse al efecto de algunos pesticidas que se utilizan en los cultivos, principalmente el glifosato, ya que la prueba revela que existe daño genético tanto en las células de las plantas con "marchitez", como en las células expuestas al glifosato.

Aunque la prueba del cometa se desarrolló como un sistema para evaluar actividad genotóxica de sustancias químicas, esta posee un gran valor como herramienta de diagnóstico del daño genético.

Los resultados obtenidos en el presente trabajo, sugieren que el glifosato es genotóxico al menos para el agave.

FIGURAS

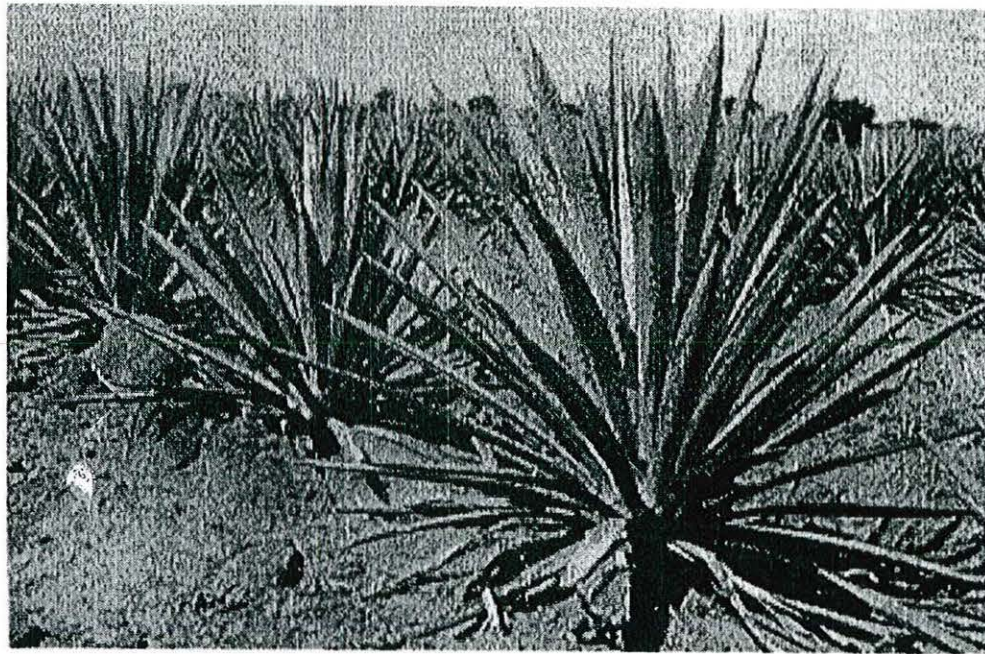


Figura 1. Planta de *Agave tequilana* Weber

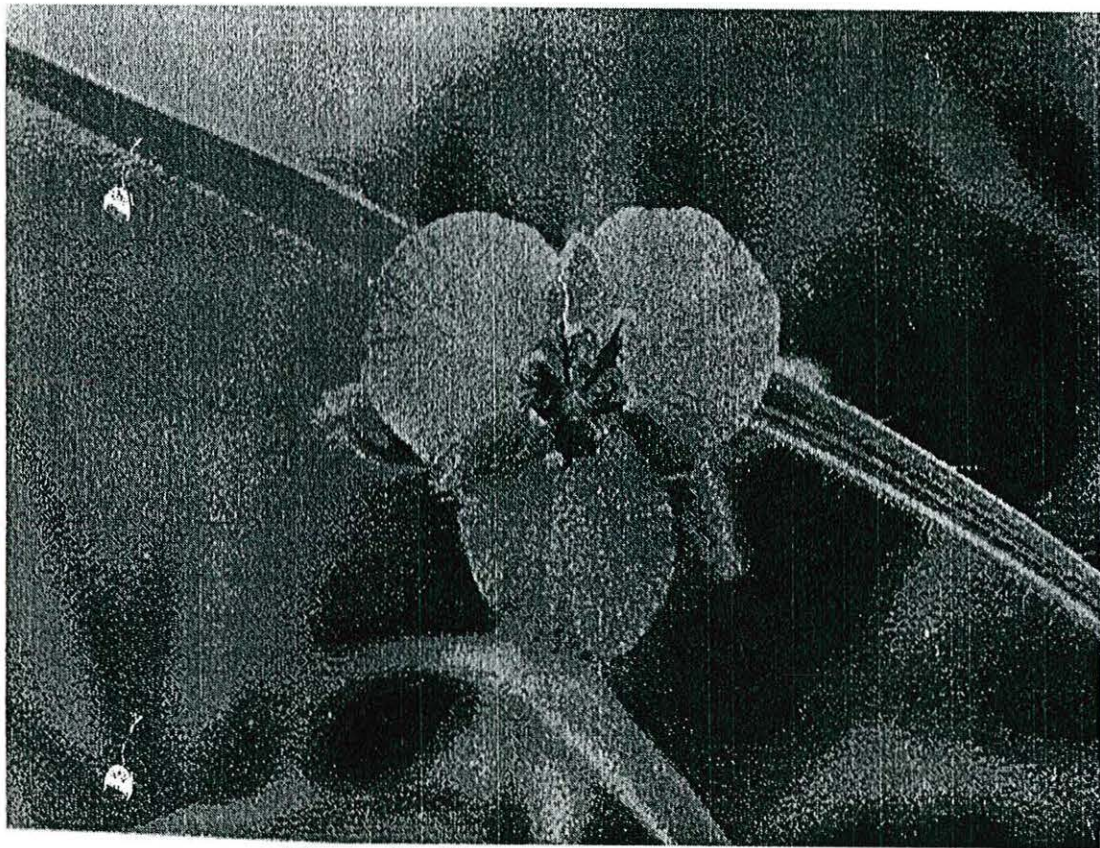


Figura 2. Flor de la planta
Tradescantia

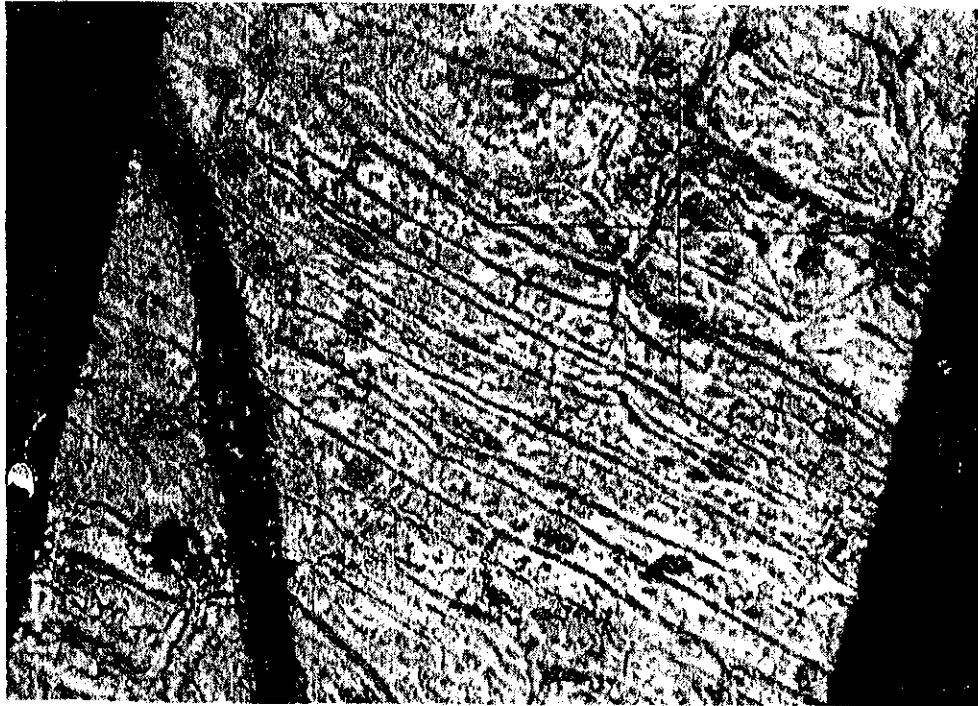


Figura 3.a. Células de Agave teñidas con orceina, 10X

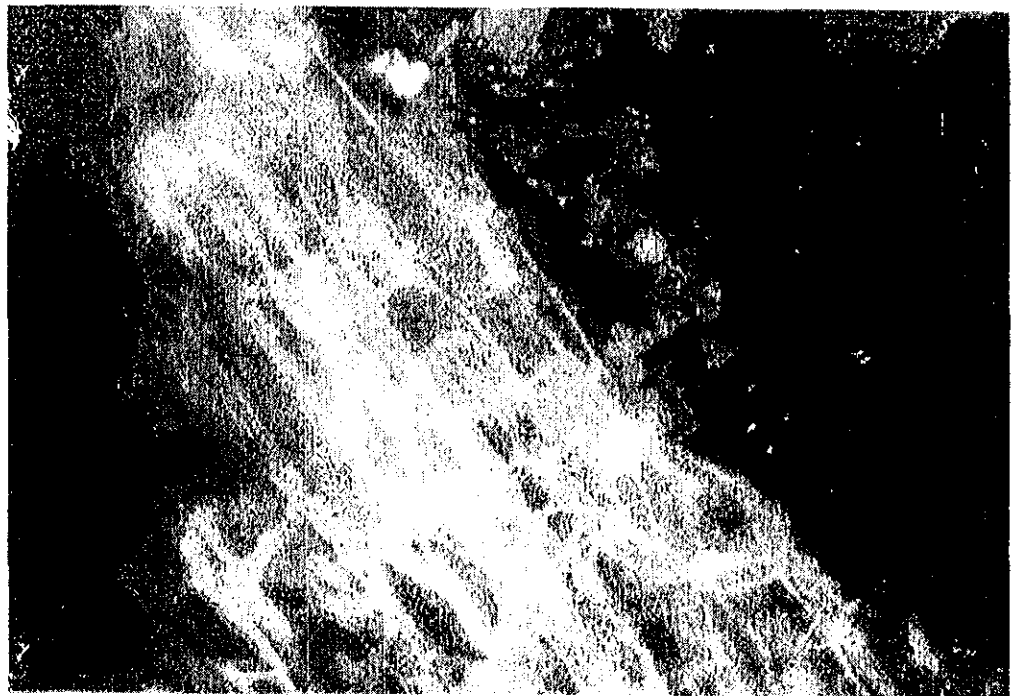


Figura 3.b. Células de agave teñidas con bromuro de etidio, 10X

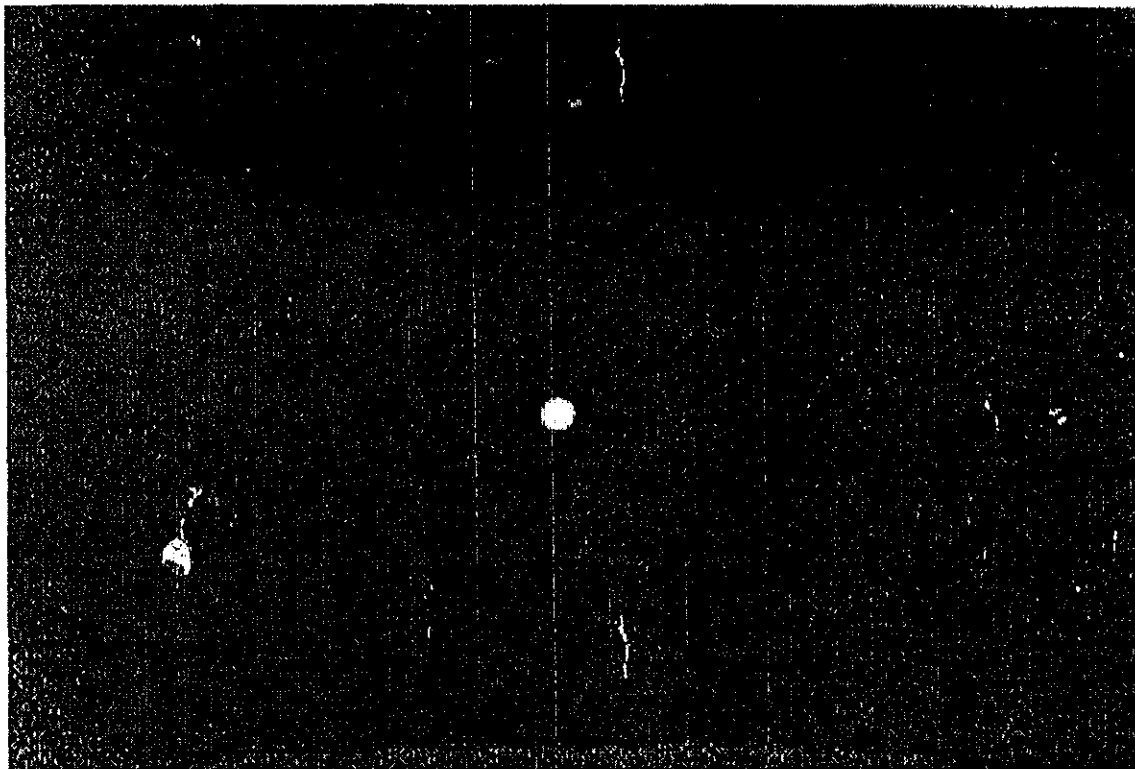


Figura 3.c. Núcleo de agave, aislado, 10X

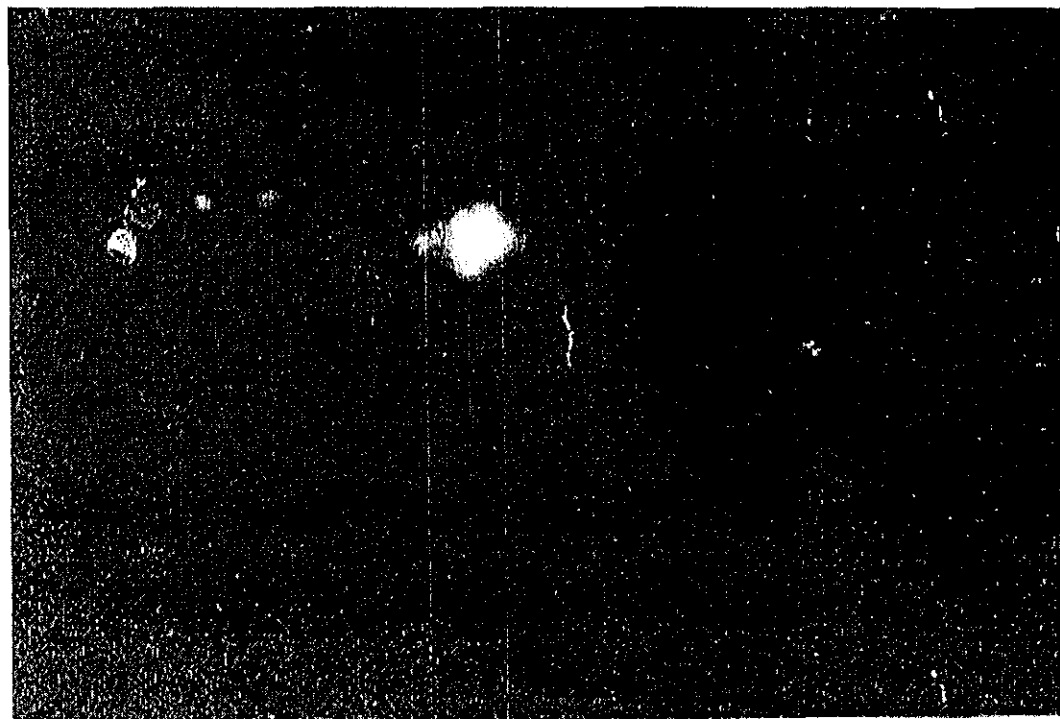


Figura 3.d. Cometa en un núcleo de Agave, 40X

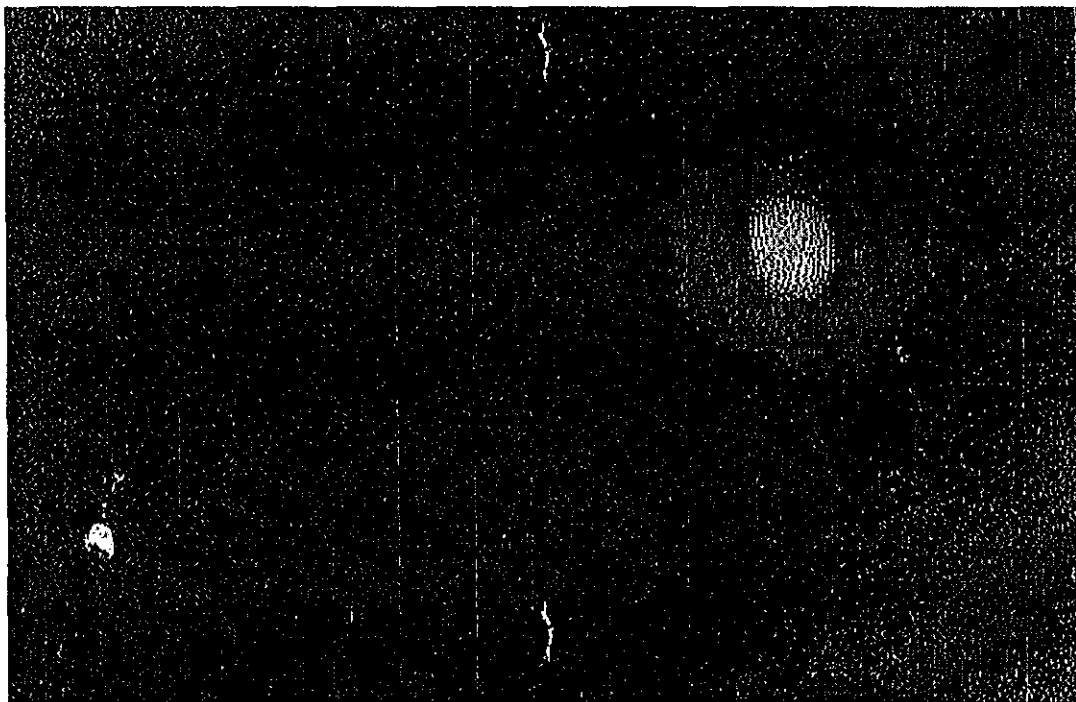


Figura 3.e. Cometa en un núcleo de agave,40X

Figura 4. Tablas y Gráficas Distribución de la longitud de migración de los núcleos en los grupos estudiados: grupo control (a), plantas expuestas a etilmetano sulfonato(b), glifosato (c), y plantas enfermas (d)

Figura 4 (a). Muestras control o no tratadas. (tabla)

Número de células	Plantas control (no tratadas) Migración en micras.
1	95
2	90
3	75
4	75
5	75
6	73
7	70
8	73
9	73
10	88
11	88
12	88
13	95
14	97
15	88
16	95
17	80
18	95
19	88
20	100
21	95
22	38
23	88
24	95
25	95
26	95

Figura 4(a). Gráfica de muestras no tratadas o control. (migración del ADN en micras).

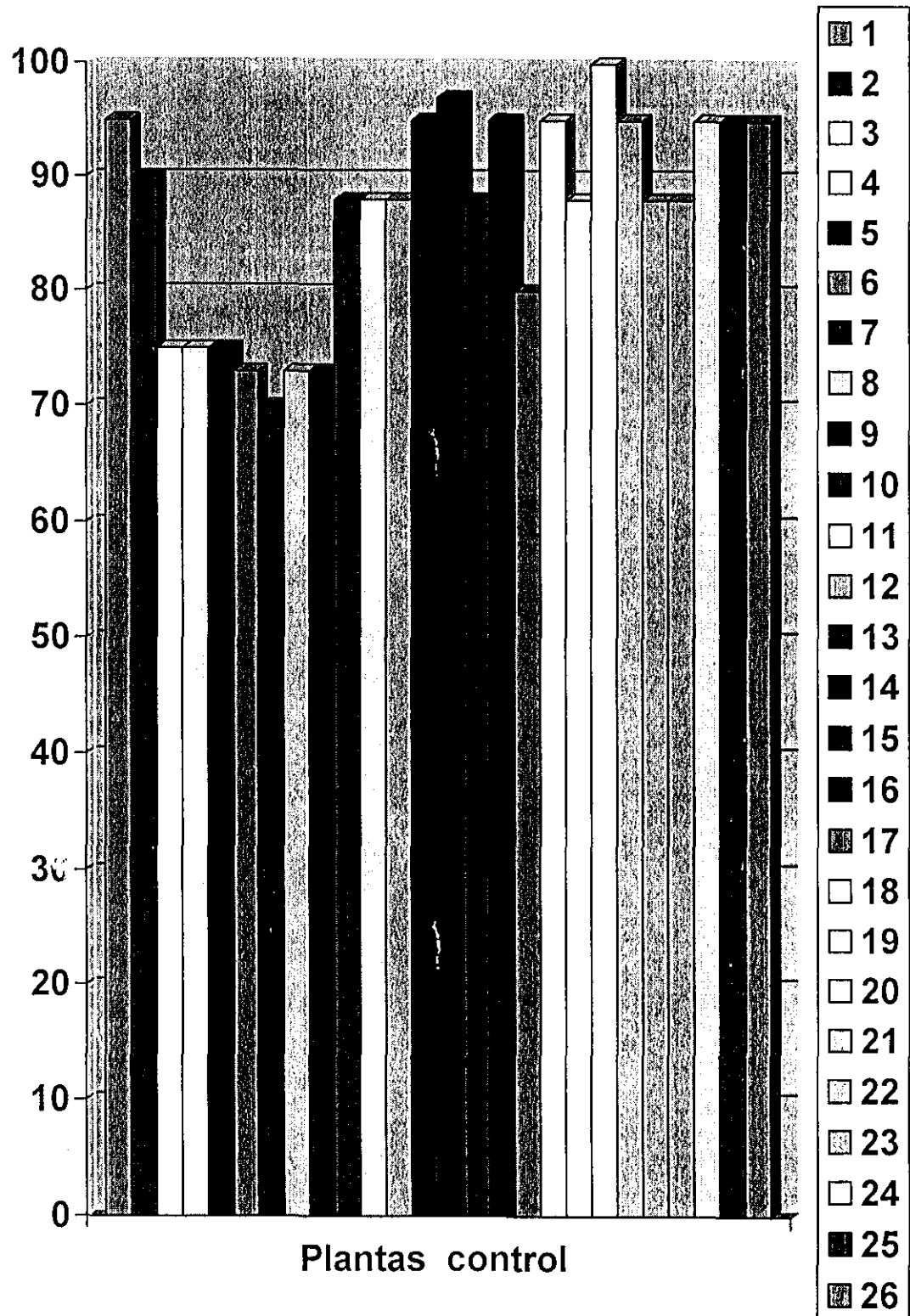
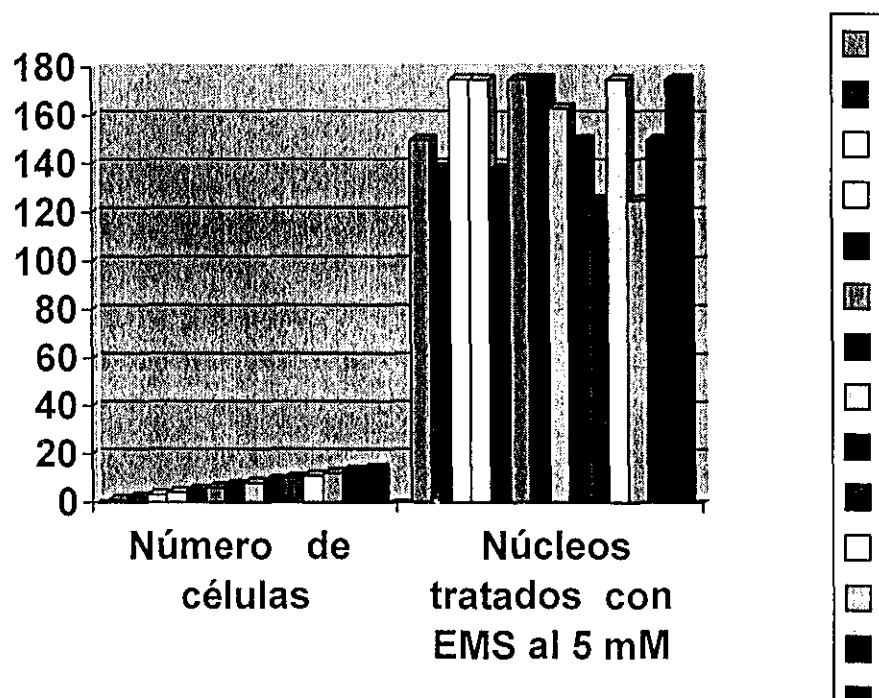


Figura 4 (b). Plántulas tratadas con EMS (Etil Metano Sulfonato) al 5 milimolar (mM). (Migración de la cauda de ADN en micras). (tabla)

Número de células	Núcleos tratados con EMS al 5 mM Migración en micras.
1	150
2	138
3	175
4	175
5	138
6	175
7	175
8	163
9	150
10	125
11	175
12	125
13	150
14	175

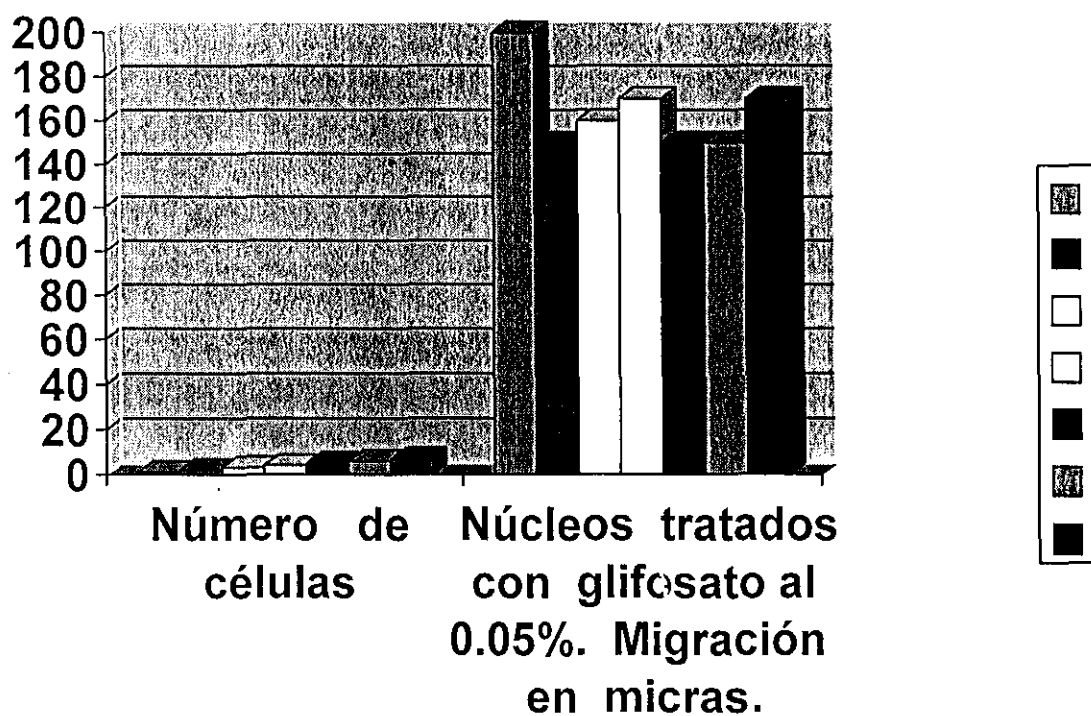


Gráfica 4(b)

Figura 4 (c). Plántulas tratadas con glifosato al 0.05%. (Migración de la cauda de ADN en micras). (Tabla)

Número de células	Núcleos tratados con glifosato al 0.05%. Migración en micras.
1	200
2	150
3	160
4	170
5	150
6	150
7	170

Gráfica 4 (c).

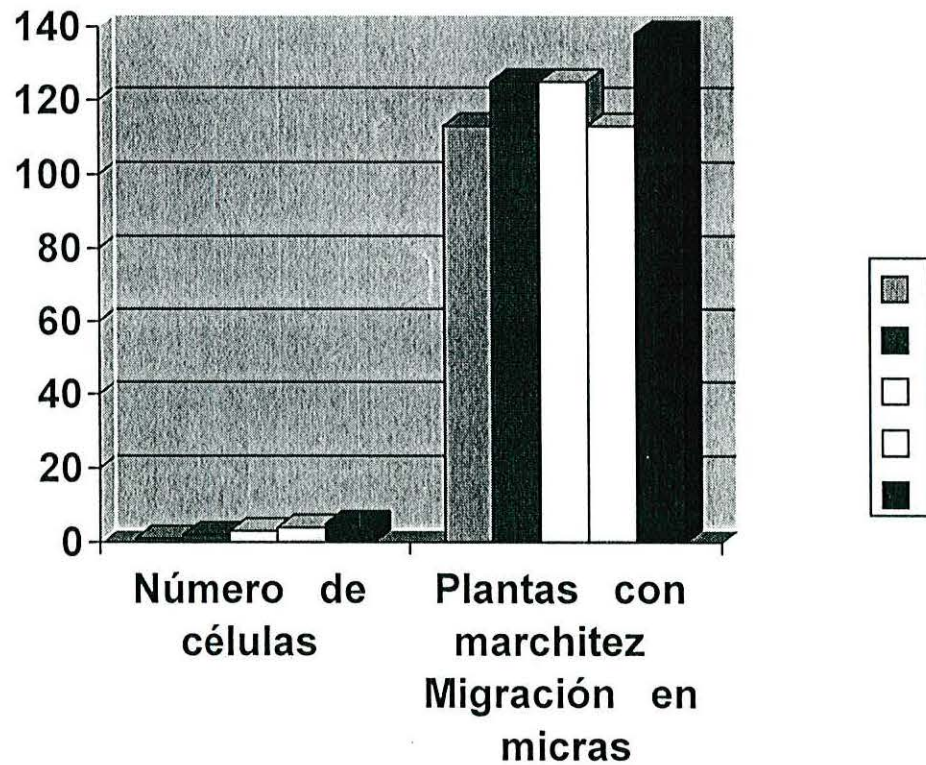




BIBLIOTECA CENTRAL

Figura 4 (d). Muestras obtenidas de cultivos con la enfermedad de la marchitez. Migración de la cauda de ADN en micras. (Tabla)

Número de células	Plantas con marchitez Migración en micras
1	113
2	125
3	125
4	113
5	138



Gráfica 4 (d)

BIBLIOGRAFIA

BIBLIOGRAFIA

- Ames D. N., Durston W. R., Yamasaki E. Lee F. D. (1973). Carcinogens are mutagens: a simple test system combining liver homogenates for activation and bacteria for detection. *Nat Acad. Sci.(USA)* 69: 3128-3132.
- Atherholt B.T., McGarrity J.G., Louis B. J., McGeorge J. L., Lioy J. P., Daisey M.J., Greenberg A. Darack F. (1984). Mutagenicity studies of New Jersey ambient air particulate extracts. En: Short-term bioassays in the analysis of complex mixtures IV (M.D. Waters, S.S. Sandhu, J. Lewtas, L. Claxton , G. Strauss y S. Nesnow, Eds.) Plenum Press, Nueva York, 211-231.
- Barnett S. B. (1982). The mutagenic potential of pulsed ultrasound. *Ultrasound Biol. Med.* 8: (suppl. 1), 10 (Abstr. 28).
- Betti C., Davini T., Giannessi L., Lopriore N. and Barale R. (1994). Microgel electrophoresis assay(comet test) and SCE analysis in human lymphocytes from 100 normal subjects. *Mutat. Res.* 307 : 323-333.
- Brinkworth M.H., Anderson D., Hughes J.A., Jackson LI., Yu T.W. and Nieschlag (1998). Genetic effects of 1,3-butadieno on the mouse testis. *Mutat. Res.* 397: 67-75.
- Carrillo-Cedillo E. Velez L.E. (1996). Plaguicidas organofosforados en aguas de riego del Valle de Mexicali, II Congreso Nacional de Ciencias Ambientales, Mazatlán, México, diciembre, 15.
- Casciano A.D. (1991). Introduction : historical perspectives of the genetic toxicology. En: Genetic Toxicology. (Li. P.A. y Heflich R.H., Eds.). CRC Press, Nueva Jersey, 1-12.
- Ciaravino V., Miller M.W. Carstensen E.L. (1986). Sister-chromatid exchanges in human lymphocytes exposed in vitro to therapeutic ultrasound. *Mutat. Res.* 172: 185-188.

Cocking E.C. (1972). Plant cell protoplasts, isolation and development. *Annu. Rev. Plant. Physiol.* 23: 29-50.

Crebelli R., Conti L., Crochi B., Carere A., Bertoli C. Giacomo N. (1995). The effect of fuel composition on the mutagenicity of diesel engine exhaust. *Mutat. Res.* 346: 167-172.

Fairhaim. D.W., Olive P.L. K.L. O'Neill (1995). The comet assay: a comprehensive review. *Mutation Res.*, 339: 37-59.

Frölich A. Würgler F.E. (1990). *Drosophila* wing-spot test: improved detectability of genotoxicity of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Mutat. Res.* 234: 71-80.

Frölich A. Würgler F.E. (1990). Genotoxicity of ethyl carbamate in *Drosophila melanogaster* wing spot test: dependence of genotype-controlled metabolic capacity. *Mutat. Res.* 244: 201-208.

Galli A. Schiestl R.H. (1995). *Salmonella* test positive and negative carcinogens show different effects on intrachromosomal recombination in G2 cell cycle arrested yeast cells. *Carcinogenesis* 16: 659-663.

Garcia, A. Galvan C. (1995). Evolución morfológica del Agave tequilero. *Guad. Méx.. Trillas.* 19-20

Gómez- Arroyo S., Abarca-Hernández J.C. Cortés-Eslava J. Villalobos-Pietrini R. (1989). Sister chromatid exchanges induced by cadmium in *Vicia faba*. *Contam. Ambient.* 3: 55-61.

Gómez-Arroyo S., Noriega-Aldana N., Osorio A., Galicia F., Ling S. Villalobos-Pietrini R. (1992a). Sister chromatid exchanges analysis in a rural population of México exposed to pesticides. *Mutat. Res.* 281: 173-179.

Gómez-Arroyo S., Rodríguez-Madrid L. y Villalobos-Pietrini R. (1992b). Chromosomal alterations induced by the thicarbomate herbicide molinate (ordram) in *Vicia faba*. *Rev. Int. Contam. Ambient.* 8: 77-80.

Graf U. (1994). The actual situation of SMART (somatic mutation and recombination test) in *Drosophila melanogaster*. *Rev. Int. Contam. Ambient.* 10: (suplemento 1), 5-7.

Graf U., Würigler F.R., Kazt A.J., Frei H., Joan H., Hall C.B. y Kale P.G. (1984). Somatic mutation and recombination test in *Drosophila melanogaster*. *Environ. Mutagen.* 6: 153-188.

Grant W.F. (1994). The present status of higher plant bioassays for the detection of environmental mutagens. *Mutat. Res.* 310: 175-185.

Grant W.F. Salamone M.F. (1994). Comparative mutagenicity of chemical selected for test in the International Program on Chemical Safety's collaborative study on plant systems for the detection of environmental mutagens. *Mutat. Res.* 310: 187-209.

Grant W.F., Lee H.G., Logan D.M. y Salamone M.F. (1992). The use of *Tradescantia* and *Vicia faba* bioassays for the in situ detection of mutagens in an aquatic environment. *Mutat. Res.* 270: 53-64.

Grella A., Spinaci A. De Filippis P. (1994). Volatile organic halogen compounds in the drinking water of the city of Rome. *Annali di Igiene* 6: 909-919.

Griggs H.G. Bender M.A. (1973). Photoreactivation of ultraviolet-induced chromosomal aberrations. *Science* 179: 86-88.

Grimler G. (1983). Chemistry. En: Environmental carcinogens. (Grimler, Ed.) Boca Ratón, Florida, 200-216.

Hart J.W. Hartley-Asp. (1983). Induction of micronuclei in the mouse: revised timing of the final stage of erythropoiesis. *Mutat. Res.* 120: 127-132.

Heddle J. A., Kirkhart M.H., Mavournin K., McGregor J.T., Newel G. W. y Salamone F. (1983). The induction of micronucleus as a measure of genotoxicity. A report of the U.S. Environmental Protection Agency Genotox Program *Mutat. Res.* 123: 183-279.

Heddle J.A., Lue C.B., Saunder E. F. Benz R.D. (1978). Sensitivity to five mutagens in Falconi's anemia as measures by the micronucleus method. *Cancer Res.* 38: 2983-2988.

Heflich R.H. (1991). Chemical mutagens. En: Genetic Toxicology (Li P.A. y Heflich H.R., Eds.) CRC press, Nueva Jersey, 143-202.

Henderson L., Wolfreys A., Fedyk J., Bourner C. Windebanks (1998). The ability of the comet assay to discriminate between genotoxins and cytotoxins, *Mutagenesis*: 13: 89-94.

Hepler P.K Wayne R.O. (1985) Calcium and plant development. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 36: 397-439

Higginson J. (1975). Cancer etiology and prevention. En : Persons at high risk of cancer (Fraumeni J.F., Ed.). Academic Press, Nueva York, 385-396.

Hoover R. Fraumeni J. F. (1975). Drugs. En: Persons at high risk of cancer (J.F Fraumeni, Ed.). Academic Press, Nueva York, 185-210.

Hsie A.W., Casciano A.W., Couch D.B., Krahm D.F., O'Neill J.P., Whitfiel B.L. (1981). The use of chinese hamster ovary cells to quantify specific locus mutation and to determinate mutagenicity of chemical. (A report of the Gen-Tox-Program). *Mutat. Res.* 86: 193-214.

(International Agency of Research of Cancer) (1987). Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans. IARC Monographs, 1-42, 7,

Ichikawa S. (1981). In situ monitoring with *Tradescantia* around nuclear power plants. *Environ. Health Perspect.* 37: 145-164.

Ichikawa S. (1992). *Tradescantia* stamen hair system as an excellent botanical tester of mutagenicity: its responses to ionizing radiations and chemical mutagens and some synergistic effects found. *Mutat. Res.* 270: 3-22.

IPCS. Environmental health criteria 159 Glyphosate (1994). World health Organization. Geneva.

Ishidate Jr. M., Harnois M. C. Sofuni T. (1988). A comparative analysis of data on the clastogenicity of 591 chemical substances tested in mammalian cell cultures. *Mutat. Res.* 195: 151-213.

Jacobson E.D., Krell K., Dempsey M.J., Lugo M.H., Ellingson O. Hench C.W. (1978). Toxicity and mutagenicity of radiation from fluorescent lamp and sunlamp in L5178Y mouse lymphoma cells. *Mutat. Res.* 51: 61-75.

Kelsey K. (1988). Effects of cigarette smoking and solvent exposure on sister chromatid exchange frequency in painters. *Environ. Mol. Mutagen.* 11: 389-399.

Kloos H. (1996). 1,2 Dibromo-3- chloropropane (DBCP) and ethylene dibromide (EDB) in well water in the Fresno/Clovis metropolitan area, California. Arch. Environ. Health 51: 291-299.

Koppen G. And Verschaeve L. (1996). The alkaline comet test on plant cell: a new genotoxicity test for DNA strand breaks in *Vicia faba* root cells. Mut. Res. 360: 193-200.

Li A. P. y Loretz L. J. (1991). Assay genetic toxicology. En : Genetic Toxicology (P. A. Li y R. H. Heflich, Eds.). CRC. Press, Nueva Jersey, pp. 119-142.

Lindsley D. L. y Grell E. H. (1968). Genetic variation of *Drosophila melanogaster* . Carnegie Instit. Publ. 627: 1-60.

Ma T.H. (1981). *Tradescantia* micronucleus bioassay and pollen tube chromatid aberration test for in situ monitoring and mutagen screening. Environmment. Health Perspect. 37: 85-90.

Marples B., Longhurst D., Eastham A.M. West C.M. (1998). The ratio of initial/residual DNA damage predicts intrinsic radiosensitivity in seven cervix carcinoma cell lines. Br-J. Cancer, 77: 1108-14

Martin F.L., Venitt S., Carmichael P.L., Crofton-Sleigh C., Stone E.M., Cole K.J., Gusterson B.A., Crover P.L. Phillips D.H. (1997). DNA damage in breast epithelial cells: Detection by the single cell gel (comet) assay and induction by human mammary lipid extracts. Carcinogenesis; 18: 2299-305.

Meltz M.L. (1991). Physical mutagens. En: Genetic Toxicology (P.A. Li y R.H. Heflich, Eds.). CRC. Press, Nueva Jersey, pp. 143-202.

Mericle L.W. Mericle R.P. (1967). Genetic nature of somatic mutations for flower color in *Tradescantia*, clone 02. Rad. Bot. 7, 449-464.

Molina A. M. (1990). Contaminantes atmosféricos primarios. Toxicología ambiental (A. L. Albert, Ed.). Editorial Limusa, México, 43-53.

Monteith D.K. Vanstone J. (1995). Comparison of the microgel electrophoresis assay and other assays for genotoxicity in the detection of DNA damage. *Mutat. Res.* 345: 97-103.

Moses M.D. (1992) Cosecha dolorosa. Pesticide Education Center, San Francisco, 114

Narendra P.S. Mc Coy M.T. Tice R.R. and Schneider L.E. (1988). A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp. Cell Res.* 175: 184-191.

Normura y Komamine (1986). Identification and isolation of single cells that produce somatic embryos at high frequency in a carrot suspension culture. *Plant Physiol.* 79: 988-991

Novel, Park S. Ana G. Valenzuela Z. (1987) "Environmental responses and productivity of the CAM plant, Agave tequilana W". *Agricultural Forest Meteorology*, núm 39: 319-334. Elsevier Science Publisher B.V., Amsterdam.

Pandurangi R., Petras M., Ralph S. Vrzoc M. (1995). Alkaline single cell gel (comet) assay and genotoxicity monitoring using buel heads and carp. *Environ. Mol. Mutagen.* 26: 345-56.

Pfuhler S., Wolf H.V. (1996). Detection of DNA crosslinking agents with the alkaline comet assay. *Environ. Mol. Mutagen.* 27: 196-201.

Ramirez C. J. Ordorica F. C. López J. O. Rios M.A., Osuna R. I. Uribe B. M. (1996). Plaguicidas en agua y camarón capturado en granjas acuícolas del centro de Sinaloa, II Congreso Nacional de Ciencias Ambientales, Mazatlán, México, 9.

Rank J. Jansen A.G. Skov B., Pedersen I.H. Jensen K. (1993). Genotoxicity testing of the herbicide roundup and its active ingredient glyphosate isopropylamine using the mouse bone marrow micronucleus test.

Salmonella mutagenicity Test and Allium anaphase-telophase Test. *Mutat. Res.* 300: 29-36.

Rendón Salcido, Luis A. (1991). Desarrollo del cultivo del Agave. III Reunión Técnica de la Asociación de Productores de *Agave tequilana Weber* o Agave Azul, Guadalajara, Jalisco, México. Folleto de divulgación de la Asociación de agaveros de Amatitán, Jal.

Salamanca F. (1990). Citogenética humana. 1ª Ed. Médica Panamericana, México D.F., 219

Schmid W. (1975). The micronucleus tests. *Mutat. Res.* 31: 9-15.

Shelby M.D. (1988). The genetic toxicity of humans carcinogens and its implications (MRT 01275). *Mutat. Res.* 204: 3-5.

Sparrow A. H., Schairer L. A. Villalobos-Pietrini-R. (1974). Comparison of somatic mutation rates induced in *Tradescantia* by chemical and physical mutagens. *Mutat. Res.* 26: 265-276.

Sram R.J. Podrazilova K., Dejmerk J., Mrackova G. Pilcikt (1998). Single cell gel electrophoresis assay: sensitivity of peripheral white blood cells in human population studies. *Mutagenesis*; 13: 99-103

Taylor J.H. (1958). Sister chromatid exchanges in tritium labeled chromosomes. *Genetics.* 43: 514-529.

Torres-Bugarín O. (1993). Estandarización de las pruebas de micronúcleos e índice mitótico para determinar genotoxicidad en plantas con actividad aglutinante-inmovilizante de los espermatozoides de ratón. Tesis de Licenciatura, Universidad de Guadalajara, Jalisco, México.

Underbrink A.C., Schairer L.A. Sparrow A.H. (1973) *Tradescantia* stamen hairs: a radiobiological test system applicable to chemical mutagenesis. In: Chemical mutagens: principles and methods for their detection. A. Hollaender Ed. Plenum Press, Nueva York, 3: 71-207.

Valenzuela Zapata, Ana Guadalupe (1998), El Agave Tequilero: su cultivo e industrialización. Monsanto. 17-19

Villalobos -Pietriní R. (1994). Términos genéticos en español. Rev. Int. Contam. Ambient. 50 a 100.

Villalobos-Pietrini R., Gómez-Arroyo S., Flores-Márquez A.S., y Ciesneros A. (1986). *Tradescantia*-micronucleus test on potassium dichromate. Contam. Ambient. 2: 63-70.

Waliszewski S.M. Pardío T.V. Chantiri N.J., Aguirre A.A. Infanzon R. y Rivera J. (1996). Contaminación de leche materna por plaguicidas organoclorados en Veracruz. II Congreso Nacional de Ciencias Ambientales. Mazatlán, México, 22.

Zou X., Xu X., Zhang J. y Zhu Z. (1995). The determination of strong mutagen MX (3-chloro-4-(dichloromethyl)-5-hydroxy-2 (5H)-furanone in drinking water in China. Chemosphere 30: 2219-2225.

Zúñiga G., Torres-Bugarín O. Ramírez-Muñoz R.P. Ramos A., Fanti-Rodríguez E. Portilla E. García-Martínez D. Cantú J.M.(1996). Spontaneous micronuclei in peripheral blood erythrocytes from 35 mammalian species. Mutation Research, Genetic Toxicology testing. 100-115.