



UNIVERSIDAD
AUTONOMA
DE ICA
RESOLUCIÓN N° 136-2006-CONAFU RESOLUCIÓN N° 432-2014-CONAFU

FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD

LÍNEA DE INVESTIGACIÓN

**Salud Pública, Salud ambiental y Satisfacción con los
Servicios de Salud**

TÍTULO

“Evaluación de la biotoxicidad de las aguas del río Ica, usando
Allium cepa como bioindicador”

DOCENTE INVESTIGADOR

ALFREDO MIGUEL BERROCAL HUALLPA

Código ORCID N° 0000-0002-2035-6640

CHINCHA ALTA, ICA – PERÚ

2020

RESUMEN

La presencia de contaminantes en el río Ica, es conocida por la población y las autoridades, sin embargo, no hay un estudio que muestre que dichos contaminantes pueden estar afectando otras formas de vida o que puedan ocasionar daños en la salud humana. El Programa Internacional de Bioensayos Vegetales, recomiendan el uso de *Allium cepa* como bioindicador de biotoxicidad. Por lo tanto, el objetivo de la presente investigación fue evaluar el efecto biotóxico de las aguas del río Ica sobre células apicales de raíces de cebolla (*Allium cepa*). Para ello desarrolló un diseño de bloques completamente aleatorio con 10 tratamientos distribuidos en 3 bloques (día de evaluación: 4, 8 y 12) y usando 4 réplicas. Las muestras de agua de río corresponde a 3 lugares, siendo estas zonas equidistantes respecto al punto central dado por el río adyacente a la zona urbana de la capital de Ica. Los tratamientos fueron río_A (agua de río usado para el riego, río_B (agua de río alejado de la zona urbana) y río_C (agua de río adyacente a la zona urbana), cada uno con 3 niveles de dilución, más el control (agua potable), siendo un total de 10 tratamientos. Se evaluó el desarrollo radicular y el índice mitótico, mediante un análisis de varianza (ANVA), y se contabilizó la presencia de anomalías cromosómicas y la citotoxicidad celular. Además, se aplicó un marcador molecular (RAPD) para comparar los perfiles moleculares del tratamiento con mayor frecuencia de aberraciones cromosómicas y el control. El CV para el día 12 de desarrollo radicular de los diferentes tratamientos, fue de 1.21 lo que supone que en este punto los tratamientos acentuaron su efecto. El tratamiento control tuvo un desarrollo radicular mayor (9.3 cm). El nivel más alto de inhibición mitótica fue de 81.81% correspondiente al tratamiento río_C3 (agua de río adyacente a zonas urbanas). Los niveles generales de toxicidad, presencia de puentes anafásicos y c-mitosis fue de 1.8 %, 0.03%, y 0.1%, respectivamente. La c-mitosis estuvo presente en todos los tratamientos excepto en el control. Se observó que solo un primer (RAPDalf5.) genera una banda polimórfica, que identifica una región génica candidata a haber ver sido afectada por compuestos biotóxico, esto interesante ya que no hay un estudio similar que complemente la aplicación del test *Allium* con el uso del marcador molecular RAPD.

ABSTRACT

Presence of pollutants in the Ica River is known to the population and the authorities, however, there is no study that shows that these pollutants may be affecting other forms of life or that they may cause damage to human health. The International Plant Bioassays Program recommends the use of *Allium cepa* as a biotoxicity bioindicator. Therefore, the objective of the present investigation was to evaluate the biotoxic effect of the waters of the Ica river on apical cells of onion roots (*Allium cepa*). To do this, he developed a completely randomized block design with 10 treatments distributed in 3 blocks (evaluation day: 4, 8 and 12) and using 4 replications. The river water samples correspond to 3 places, these areas being equidistant from the central point given by the river adjacent to the urban area of the capital of Ica. The treatments were rio_A (river water used for irrigation, rio_B (river water far from the urban area) and rio_C (river water adjacent to the urban area), each with 3 levels of dilution, plus the control (water drinking), being a total of 10 treatments. Root development and mitotic index were evaluated by means of an analysis of variance (ANVA), and the presence of chromosomal abnormalities and cellular cytotoxicity were counted. In addition, a molecular marker was applied (RAPD) to compare the molecular profiles of the treatment with the highest frequency of chromosomal aberrations and the control. The CV for day 12 of root development of the different treatments was 1.21, which means that at this point the treatments accentuated their effect. The control treatment had a higher root development (9.3 cm). The highest level of mitotic inhibition was 81.81% corresponding to the rio_C3 treatment (river water adjacent to urban areas). The general levels of toxicity, presence of anaphasic bridges and c-mitosis was 1.8%, 0.03%, and 0.1%, respectively. C-mitosis was present in all treatments except the control. It was observed that only a primer (RAPDalf5.) Generates a polymorphic band, which identifies a candidate gene region to have been affected by biotoxic compounds, this interesting since there is no similar study that complements the application of the *Allium* test with the use of the RAPD molecular marker.

INDICE GENERAL

Resumen.....	¡Error! Marcador no definido.
Abstract.....	2
Índice general	¡Error! Marcador no definido.
I. INTRODUCCIÓN	5
II. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	7
2.1. Problema identificado	7
2.2. Pregunta de investigación General	7
2.3. Pregunta de investigación Específicas	7
2.4. Justificación e importancia.....	8
2.5. Objetivo General	8
2.6. Objetivos Específicos.....	8
2.7. Impacto de la Investigación	9
III. ESTADO DEL ARTE	9
3.1. Antecedentes.....	9
3.2. Marco Teórico	12
IV. METODOLOGÍA APLICADA.....	¡Error! Marcador no definido.16
4.1. Tipo y nivel de Investigación.....	16
4.2. Diseño de la Investigación	16
4.3. Hipótesis General	19
4.4. Hipótesis Específicas.....	19
4.5. Variables.....	19
4.6. Operacionalización de Variables.....	20
4.7. Población y Muestra	20
4.8. Recolección de la Información.....	20

4.9. Analisis Estadistico	22
V. ANÁLISIS E INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS	23
5.1. Resultados del diseño experimental	23
5.2. Resultados del analisis citogenético	24
5.3. Resultados del analisis molecular	26
VI. DISCUSIÓN DE RESULTADOS	27
VII. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	31
VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	32
IX. ANEXOS	¡Error! Marcador no definido.36
Anexo 1: tabla 4. Base de datos del diseño experimental	36
Anexo 2: Informe de Turnitin al 28% de similitud	¡Error! Marcador no definido.

I. INTRODUCCION

El río Ica se encuentra contaminado por aguas servidas y por la presencia de residuos sólidos (basura y desmonte), según lo ha informado la Administración Local del Agua, ALA. La presencia de contaminantes en este cuerpo de agua afecta directamente el desarrollo de vida en el río (que incluyen microorganismos), que de modo directo o indirecto afecta la calidad de vida y salud humana. Además, el agua muchas veces es usado en el riego de cultivos propios de la región, que podrían verse afectados en su rendimiento y sobre todo en su calidad. *Allium cepa* (cebolla) es un bioindicador de mucha utilidad y de fácil aplicación en investigaciones sobre la biotoxicidad de diferentes sustancias que en la mayoría de casos son destinados al consumo humano.

El Programa Internacional de Bioensayos Vegetales, de la Real Academia Sueca de las Ciencias y el GENE-TOX-PROGRAM, recomiendan el uso de *Allium cepa* como un buen bioindicador de biotoxicidad y genotoxicidad (Bonciu et al., 2018). El fundamento es simple, debido a que cuando un bulbo de *Allium cepa* (cebolla) se rehidrata, esto estimula a las células del ápice radicular, que induce la división celular de estas, lo cual se evidencia como una elongación de las raíces de la planta. Sin embargo, cuando el proceso de rehidratación se realiza en presencia de sustancias contaminantes (tóxicas), la división celular de las células apicales de la raíz puede bloquearse, produciendo la paralización de la maquinaria mitótica y muchas veces destruyendo las células (Konuk et al., 2007).

El uso del test *Allium*, permite plantear un modelo adecuado y sencillo para realizar ensayos sobre sustancias contaminantes, mutagénicas o cancerígenas cuyos datos pueden ser extrapolados a toda la biodiversidad de plantas y animales (Bosio & Laughinghouse IV, 2012; Evseeva et al., 2003).

Por otro lado, el uso de marcadores moleculares basados en ADN no solo permite caracterizar especies, si no también se puede aplicar para la detección de mutaciones (deleciones) producto de daños ocasionado por la exposición del ADN a compuestos genotóxicos (Barakat et al., 2010;

Yunus et al., 2013). Para poder explorar aleatoriamente los posibles daños ocurridos en ADN de una especie, es preferible aplicar el RAPDs ya que la visualización de bandas obtenidas mediante esta técnica, involucra cualquier región del genoma de la especie en estudio (Azofeita-delgado, 2006).

Por lo manifestado, el uso del test *Allium* permite conocer el efecto citotóxico y genotóxico de diferentes compuestos, y además puede dar a conocer el grado o niveles de daño producido por estos compuestos, esto mediante el uso adecuado de un diseño experimental, que tome en cuenta aspectos de la biología, fisiología y genética de *Allium cepa*, así como consideraciones propias del desarrollo de un buen diseño experimental (repeticiones, aleatorización, ajuste a un modelo lineal).

La presente investigación resulto más interesante, ya que complemento el uso del test *Allium* y el uso del marcador molecular RAPD, con la finalidad de identificar una posible región génica afectada por la exposición de las células de *Allium* a compuestos tóxicos, o su asociación con la presencia de anomalías cromosómicas identificadas en el estudio.

II. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

2.1. PROBLEMA IDENTIFICADO

Es una situación conocida que el río Ica se encuentran contaminado, por la presencia y drenaje de aguas servidas, así también por el arrojado de residuos sólidos (según el ALA, Administración Local del Agua). La contaminación del río podría estar afectando la producción y calidad de los cultivos de los pequeños y medianos agricultores, que usan el agua del río para regar sus cultivos, siendo principalmente los productores de hortalizas. Por otro lado, el río Ica también está contaminado con basura, asociado a un recojo de basura deficiente por parte de las autoridades. Permite que recolectores informales boten la basura al río. Ica es la principal región agroexportadora del país. Los agroexportadores indican que las aguas superficiales en Ica no afectan a su sector, ya que ellos utilizan las aguas subterráneas mediante el sistema de pozos. Pero si el problema persiste, eventualmente podría llegar a contaminar. Si bien, existe una Junta de Regantes de Ica, que agrupan a unos 14 mil agricultores (pequeños, medianos y grandes) estos no denuncian tanto el vertimiento de aguas servidas como de desechos.

2.2. PREGUNTAS DE INVESTIGACIÓN GENERAL Y ESPECÍFICAS

2.2.1. Pregunta general:

- ¿Existe un efecto biotóxico de las aguas del río Ica sobre células apicales de raíces de cebolla (*Allium cepa*)?

2.2.2. Preguntas específicas:

- ¿Se puede evaluar la citotoxicidad de las aguas del río Ica sobre el desarrollo radicular de *Allium cepa*?
- ¿La presencia de aberraciones cromosómicas en *Allium cepa*, está asociado con diferentes niveles de biotoxicidad?
- ¿La variación de los índices mitóticos está correlacionado con diferentes niveles de toxicidad?
- ¿Es posible detectar mutaciones en el material genético, producido

por agentes tóxicos presentes en el agua de río, usando marcadores RAPD?

2.3. JUSTIFICACIÓN E IMPORTANCIA

La Dirección de Salud Ambiental del Gobierno Regional de ICA, ha indicado que el consumo de productos agrícolas regados con aguas mal tratadas puede ocasionar daños en la salud de la población iqueña. Por lo general, los patógenos que afectan a humanos no afectan a cultivos agrícolas. Sin embargo, existe la posibilidad que estos se alojen temporalmente en los frutos u hojas que son consumidos por la población, debido al uso de aguas servidas. Cabe indicar que en el Valle de Ica además de frutales, se siembra algodón, vid, paltos, cítricos, pallares, frejoles, entre otros cultivos, que son de alta demanda en la población nacional. Por otro lado, la basura presente en el río Ica, se descompone principalmente cuando el cauce del río está seco, generando contaminación por infiltración. Este cuerpo de agua (río) con altos niveles de toxicidad no solo puede afectar la calidad de productos agrícolas, si no también afecta de modo directo a la biodiversidad que aún existe en el río Ica. Si bien se sabe sobre los altos niveles de contaminación del río Ica, no se tiene un estudio concreto con evidencia experimental de efectos citotóxicos y menos genotóxicos que muestren la importancia y necesidad de tomar medidas correctivas en corto y mediano plazo.

2.4. OBJETIVO GENERAL Y ESPECIFICOS

2.4.1. OBJETIVO GENERAL

- Evaluar el efecto biototóxico de las aguas del río Ica sobre células apicales de raíces de cebolla (*Allium cepa*).

2.4.2 OBJETIVO ESPECÍFICO

- Evaluar la citotoxicidad de las aguas del río Ica sobre el desarrollo radicular de *Allium cepa*.
- Evaluar la presencia de aberraciones cromosómicas en *Allium cepa*.
- Determinar los índices mitóticos de los distintos tratamientos.
- Comparar los perfiles moleculares del tratamiento con mayor

frecuencia de aberraciones cromosómicas y el tratamiento control.

- Realizar los análisis de varianza y de comparación de medias para los diferentes tratamientos.

2.5 IMPACTO DE LA INVESTIGACIÓN

El impacto estuvo orientado en generar información confiable basada en investigación experimental, que permita demostrar el grado de afectación que puede tener o está teniendo el uso de las aguas del río Ica sobre los cultivos de la región, y su potencial de daño en la salud de la población de la región Ica y de todo el Perú que consumen los cultivos producidos por esta región. Generar conciencia en base a resultados obtenidos, y la puesta en marcha de medidas correctivas, puede traer mejorías en las condiciones de calidad ambiental que tiene actualmente la población de Ica, esto en mediano y largo plazo asegura un desarrollo sostenido de calidad para la población basada en un ambiente sano y una alimentación de calidad.

III. ESTADO DEL ARTE

3.1. ANTECEDENTES

Existen antecedentes del uso de plantas superiores para realizar un seguimiento ambiental mediante la toxicología genética. La creciente descarga de productos químicos peligrosos en el medio ambiente ha afectado el equilibrio de los ecosistemas naturales y en consecuencia, ha llamado la atención de varios investigadores y agencias gubernamentales para la salud. Entre los daños causados por la exposición de organismos vivos a agentes químicos, tenemos los efectos genotóxicos y mutagénicos que han demostrado ser preocupantes, por su capacidad de inducir daño genético, que podrían ocasionar a varios problemas de salud y también afectar a las generaciones futuras, ya que estas alteraciones pueden ser heredables (Leme & Marin-Morales, 2009). De ahí la necesidad de identificar compuestos que reaccionan con el ADN para asegurar la calidad ambiental ha llevado al desarrollo de varios ensayos de genotoxicidad y mutagenicidad en una amplia gama de organismos. Los sistemas de

prueba se pueden dividir en grupos según el sistema empleado y su punto final genético detectado. Bioensayos con procariotas permiten la detección de agentes que inducen genes mutaciones y daños primarios del ADN. Por otro lado, analiza con eucariotas permiten la detección de un mayor grado de daño, variando desde mutaciones genéticas hasta daños cromosómicos y aneuploidías (Samuel et al., 2010).

Actualmente, entre las especies de plantas superiores utilizadas para evaluar contaminación ambiental, las más frecuentes son *Allium cepa*, *Vicia faba*, *Zea mays*, *Tradescantia*, *Nicotiana tabacum*, *Crepis capillaris* y *Hordeum vulgare* (Aksoy, 2017). Además, entre estas especies a *Allium cepa* se ha considerado favorable para evaluar daños cromosómicos y alteraciones en el ciclo mitótico, debido a la presencia de buenas características cromosómicas, como grandes cromosomas y en un número reducido ($2n = 16$) (Bosio & Laughinghouse IV, 2012). Además, este sistema de prueba ha demostrado una alta sensibilidad en detección de productos químicos ambientales. Basado en el empleo del test de *Allium cepa* como ensayo para evaluar la calidad ambiental, existen varios artículos resultados favorables del test *Allium cepa* y su eficacia en la evaluación de agentes genotóxicos y mutagénicos presentes en diferentes entornos (Akinboro & Bakare, 2007; Bosio & Laughinghouse IV, 2012; Datta et al., 2018; Kumari et al., 2009; Leme & Marin-Morales, 2009; Tartar et al., 2006).

Existen modificaciones del test *Allium cepa* para evaluar la contaminación debido a agentes biotóxicos. Desde que inició el uso del test *Allium cepa* en el monitoreo de contaminantes (Leme & Marin-Morales, 2009), se ha demostrado alteraciones en el huso mitótico debido al uso de sustancias como la colchicina. Posteriormente, también se demostró que diferentes soluciones de sales orgánicas indujeron varios tipos de aberraciones cromosómicas en células de las raíces meristemáticas de de *A. cepa*, desde entonces, se ha realizado modificaciones o ajustes técnicos en el test de *A. cepa*. Por ejemplo se han realizado ajustes con el fin de permitir una evaluación de productos químicos, así como mezclas complejas, que comprenden la mayoría de muestras ambientales (Bagatini et al., 2009). La mayoría de modificaciones propuestas por los autores estaban

relacionados con la evaluación de aberraciones cromosómicas, que detectan potencialmente agentes genotóxicos. Por otro lado, también se hicieron modificaciones del test para evaluar los efectos mutagénicos, a través de la observación de los micronúcleos (Barbério et al., 2009; Christofolletti et al., 2013). Se sabe que las aberraciones cromosómicas, como la fragmentaciones y pérdidas de cromosomas, puede resultar en células micronucleadas, ya que tanto los fragmentos como la totalidad los cromosomas no se pueden incorporar al núcleo principal durante el ciclo celular. Varios estudios indican que entre los puntos finales evaluables, los micronúcleos son los más efectivos y simples indicadores de daños citológicos, lo que hace que el análisis de este parámetro sea más eficiente para evaluar la contaminación debido a sustancias. Sin embargo, una diferencia de la evaluación de aberraciones cromosómicas como punto final no solo es válido solo para detectar efectos genotóxicos, sino también para evaluar los mecanismos de acción de los agentes. Así, el análisis de aberraciones cromosómicas, además de estimar efectos genotóxicos de agentes probados, también permite la evaluación de sus acciones clastogénicas y aneugénicas. Los análisis de aberraciones cromosómicas y micronúcleos en *Allium cepa*, han sido reportados en la literatura como indicadores eficientes de acción directa sobre el ADN.

Adicionalmente, el análisis de aberraciones cromosómicas en *Allium cepa*, han demostrado ser más ventajoso, ya que varios autores han demostrado la eficiencia de éste para investigar los mecanismos de acción de agentes probados en el ADN, lo que permite una mejor comprensión de los efectos promovidos por tales agentes(Akinboro & Bakare, 2007; Liman et al., 2010). Las aberraciones cromosómicas se caracterizan por cambios en la estructura o el número total en cualquiera de los cromosomas, que pueden ocurrir tanto de manera espontánea, así como el resultado de la exposición a agentes tóxicas. Las alteraciones cromosómicas estructurales pueden ser inducidas por varios factores, como roturas del ADN, inhibición de la síntesis de ADN y fallas en la replicación del ADN. Las aberraciones cromosómicas numéricas, por ejemplo, las aneuploidías y poliploidías, son consecuencias de anomalías en la segregación de cromosomas, que puede ocurrir de forma espontánea o por la acción de agentes

aneugénicos.

Para evaluar anomalías cromosómicas mediante la prueba de *Allium cepa*, se consideran varios tipos de aberraciones cromosómicas en las diferentes fases de la división celular (profase, metafase, anafase y telofase). Sin embargo, estos análisis no son sencillos de realizar, ya que requiere un conocimiento preciso de las fases de la división celular y sus posibles anomalías. Debido a este problema problemático, algunos estudios hicieron algunas recomendaciones en el test *Allium cepa*, a modo de facilitar el análisis de aberraciones cromosómicas para científicos que no trabajan en el área de citología, proponiendo el análisis de anomalías solo en anafase y telofase (Cabuga Jr. et al., 2017; Türkoğlu, 2007).

3.2. MARCO TEORICO

3.2.1. Fundamentos de la aplicación del test *Allium cepa*.

Como se mencionó anteriormente, la prueba de *A. cepa* permite la evaluación de diferentes criterios de valoración genética. A continuación, mencionamos algunas categorías genéticas:

a. Índice mitótico

El índice mitótico (IM), caracterizado por el número total de células en división, se ha utilizado como un parámetro para evaluar la citotoxicidad de varios agentes. El nivel de citotoxicidad de un agente puede ser determinado por el aumento o la disminución del IM. Los IM significativamente más bajos que los del control negativo puede indicar alteraciones, derivadas de la acción química en el crecimiento y desarrollo de organismos expuestos (Chakraborty et al., 2009). Por otro lado, los IM más altos que el control negativo son el resultado de un aumento en la división celular, que puede ser perjudicial para las células, lo que lleva a una proliferación celular desordenada e incluso a la formación de tejidos tumorales. Sin embargo, tanto la reducción como el aumento de IM son indicadores importantes en el seguimiento de la contaminación ambiental, especialmente para la evaluación de contaminantes que presentan toxicidad y potencial citotóxico (Leme & Marin-Morales, 2009).

Se ha demostrado que la disminución del MI de las células meristemáticas

de *A. cepa* puede ser considerado como un método confiable para determinar la presencia de agentes citotóxicos en el medio ambiente, por tanto, pueden considerarse como prueba sensible para estimar los niveles de contaminación. Por lo tanto, varios estudios han utilizado la evaluación de IM para detectar citotoxicidad y la mayoría de ellos han mostrado resultados satisfactorios para los análisis propuestos (Barbério et al., 2009; Chakraborty et al., 2009; Datta et al., 2018).

b. Anormalidades nucleares

Se han incluido recientemente otro criterio de valoración en el análisis de aberraciones cromosómicas (AC) en células meristemáticas de *Allium cepa*, dicho punto final se refiere a anomalías nucleares (AN). Las AN se caracterizan por alteraciones morfológicas en los núcleos interfásicos, como resultado de la acción del agente contaminante. Generalmente, estas alteraciones se observan en la prueba de *Allium cepa* como núcleos lobulados, núcleos que llevan brotes nucleares, células polinucleares, mini células, entre otras (Akinboro & Bakare, 2007; Liman et al., 2010).

La evaluación de NA, junto con CA, ha demostrado ser un análisis, para investigar las acciones del agente contaminante, e incluso más precisos en relación con sus efectos sobre el ADN de organismos expuestos. La presencia de núcleos lobulados y células polinucleares pueden indicar un proceso de muerte celular (Leme, 2010).

3.2.2. Ventajas del procedimiento técnico del test *Allium cepa*

El test de *Allium cepa* es considerado por muchos autores como un ensayo de bajo costo y fácil manejo, que presenta algunas ventajas sobre otras pruebas a corto plazo empleadas en el monitoreo de contaminantes. Una de las ventajas del test *Allium cepa* es la posibilidad de poder exponer al organismo directamente a mezclas complejas sin tratamiento previo de la muestra a estudiar. Por ejemplo, en procesos de extracción y concentración de muestras necesarias para realizar algunos bioensayos como el test de Ames (ensayo biológico para evaluar el potencial mutagénico de compuestos químicos) (Barbério et al., 2009; Chakraborty et al., 2009; Ping et al., 2012).

Otra ventaja de este test es la presencia de un sistema de enzimas oxidadas, que son esenciales para evaluaciones de promutágenos. Por lo tanto, mientras que otras pruebas, por ejemplo, el test de Ames requiere adición de la mezcla S9 (fracción S9 de hígado de rata), *Allium cepa* presenta capacidad metabólica para activar promutágenos en mutágenos sin la adición de un sistema metabólico exógeno para evaluar esta clase de contaminante. Sin embargo, cuando el sistema de la enzima oxidasa de plantas superiores se compara con las enzimas del citocromo P-450 de mamíferos, el complejo enzimático de plantas presenta una baja concentración y una limitación en la especificación del sustrato. Sin embargo, los resultados de los bioensayos en plantas no deben descartarse, considerando que un químico capaz de inducir daños cromosómicos en plantas, también puede ser un riesgo a otros grupos de organismos vivos, ya que el daño que puede ocurrir en el material del ADN, es común a todos los organismos (Radić et al., 2010).

3.2.3. El empleo del test *Allium cepa* para detectar diferentes clases de contaminantes

El test *Allium cepa* se ha utilizado para detectar una gran variedad de contaminantes ambientales y los resultados obtenidos han sido satisfactorio para la mayoría de los estudios informados. A continuación, se reportan algunas clases de contaminantes que muestran ser sensibles al test *Allium cepa* (Bagatini et al., 2009; Ping et al., 2012).

a. Mezclas complejas.

Las mezclas complejas son la mayor parte de las muestras, ya que pueden sufrir la influencia de varias fuentes contaminaciones. Por lo tanto, se han realizado varios estudios utilizando el test *Allium cepa* para evaluar muestras ambientales, como agua y muestras de suelo de áreas contaminadas, y la mayoría de ellas han mostrado resultados positivos (Bagatini et al., 2009; Leme & Marin-Morales, 2009).

En cuanto a la contaminación del agua, se ha demostrado que el test *Allium cepa* es una prueba sensible para evaluar la calidad del agua con potencial genotóxico de las plantas industriales, efluentes de ríos, aguas superficiales

y subterráneas de zonas industrializadas y áreas urbanas. Se han informado resultados positivos de la inducción de anafases aberrantes en las células meristemáticas radiculares *Allium cepa* en la evaluación de la genotoxicidad de muestras de aguas residuales y efluentes industriales, siendo este último influenciada por vertidos de fábrica textil y papelera (Leme & Marin-Morales, 2009)(Bagatini et al., 2009).

Algunos estudios han informado para todas las muestras estudiadas de agua recolectadas, que la presencia de aberraciones cromosómicas y micronúcleos pueden estar relacionadas con la presencia de algunos metales pesados (Pb, Zn, Co, Cd y Cu), detectados en las muestras de modo complementario mediante análisis químico. En este sentido se ha recomendado el uso del test *Allium cepa* en el biomonitorio de la contaminación acuática por su sensibilidad para detectar mutágenos en aguas residuales (Bonciu et al., 2018; Chakraborty et al., 2009).

3.2.4. Estudios de sensibilidad y correlación entre la prueba de *Allium* y otros sistemas de prueba.

Los estudios de sensibilidad y correlación entre diferentes sistemas de prueba son fundamental para una evaluación más precisa del riesgo de contaminantes medioambientales, así como la extrapolación de datos a otros organismos objetivo, por ejemplo, el hombre. Las pruebas para detectar los riesgos para la salud humana se realizan utilizando varios sistemas de prueba que utilizan una amplia variedad de organismos, ya que el uso de seres humanos para este tipo de evaluaciones está prohibido por razones éticas (Bonciu et al., 2018).

3.2.4. Uso de marcadores moleculares para detectar mutaciones

Las técnicas moleculares son de gran ayuda para comprender las respuestas de las células vegetales frente a la inducción de una mutación. También proporcionan una mejor comprensión del potencial y las limitaciones de la generación de mutaciones, lo que puede conducir a la identificación temprana de cambios benéficos o perjudiciales (Barakat et al., 2010; Yunus et al., 2013).

Para este fin se han utilizado técnicas de marcadores moleculares, como

el análisis de ADN polimórfico amplificado al azar (RAPD), para evaluar las variaciones producidas por sustancias mutagénicas. Los RAPD son eficaces para el cribado del polimorfismo de la secuencia de nucleótidos entre individuos, ya que cada cebador (en promedio) dirigirá la amplificación de varios loci discretos dentro de un genoma. Como los cebadores modificados incluso por un solo nucleótido producen diferentes perfiles de bandas, la técnica RAPD puede generar polimorfismos entre individuos muy relacionados. Las principales ventajas de RAPD son el bajo costo y su fácil aplicación (Barakat et al., 2010; Hofmann et al., 2004; Williams et al., 1993; Yunus et al., 2013).

IV. METODOLOGIA APLICADA

4.1. TIPO Y NIVEL DE LA INVESTIGACIÓN

La investigación “Evaluación de la biotoxicidad de las aguas del río Ica, usando *Allium cepa* como bioindicador” fue de tipo experimental, ya que implicó la instalación de un ensayo experimental basado en el *test Allium*, y aplicada ya que los resultados obtenidos rápidamente pueden ser objeto de valoración y una alerta sobre el estado de contaminación de las aguas del río Ica.

4.2. DISEÑO DE INVESTIGACIÓN

El método a aplicarse fue de tipo experimental, para el cual se desarrolló un diseño de bloques completamente aleatorio con 10 tratamientos distribuidos en 3 bloques y usando 4 réplicas. Los puntos (tiempos) de muestreo fueron considerados como bloques (día de evaluación: 4, 8 y 12), y los tratamientos corresponden a 3 lugares donde se tomaron las muestras de agua, siendo estas zonas equidistantes respecto al punto central dado por el río adyacente a la zona urbana de la capital de Ica. Los tratamientos se codificaron de la siguiente manera control (agua potable), rio_A (agua de río usado para el riego, rio_B (agua de río alejado de la zona urbana) y rio_C (agua de río adyacente a la zona urbana), los niveles de los tratamientos, rio_A1, rio_A2 y rio_A3, están referidos a diluciones de las

muestras de agua de río. En el caso de A3 no está diluida y representa una proporción de 3:3 es decir 3 porciones de agua de río respecto un total de 3 porciones, A2 representa una proporción de 2:3 es decir 2 porciones de agua de río respecto un total de 3 porciones (una porción se completa usando agua potable), y A1 representa una proporción de 1:3 es decir 1 porción de agua de río respecto un total de 3 porciones (dos porciones se completan con agua potable), de modo similar fue para las diluciones de río_B y río_C.

El efecto de los tratamientos puede determinarse en forma indirecta, mediante la comparación de la elongación de las raíces (desarrollo radicular) de los bulbos de cebolla expuestos al agua de río contaminado contra la de bulbos no expuestos (tratamiento control). A partir de los valores de desarrollo radicular se pueden cuantificar y comparar otras variables derivadas de esta, como por ejemplo el porcentaje de crecimiento radicular (%CR) de las raíces.

También se calculó los índices mitóticos, y se contabilizó la frecuencia y el tipo de aberraciones cromosómicas observadas en los distintos tratamientos. Para esto se realizó tinciones con orceína acética, a modo de poder identificar aberraciones cromosómicas en el microscopio óptico con un aumento de 400X y 1000X.

La ocurrencia de aberraciones cromosómicas está asociado a efectos genotóxicos que podrían identificarse mediante el uso de un marcador molecular (RAPD) que permite explorar la acción mutagénica del agua contaminada.

4.2.1. Extracción y cuantificación del ADN

La extracción del ADN se realizó por el método CTAB modificado de Doyle y Doyle (1990). La pureza y concentración del ADN se determinó mediante el uso del espectrofotómetro. La relación de lectura de absorbancia de A260/A280 proporcionó un estimado de pureza. Una solución de ADN pura tiene una relación A260/A280 a razón de 1.7 a 1.9. Una relación inferior a 1.7 indica que pueden existir proteínas y otros elementos absorbentes de luz ultravioleta en la muestra, y una relación superior a 1.9 indica que las muestras pueden estar contaminadas con fenol o cloroformo.

4.2.2. Procedimiento de amplificación de ADN mediante RAPDs

Los RAPD (fragmentos polimórficos amplificados al azar) son marcadores arbitrarios amplificados por la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Para la optimización del protocolo se probó diferentes concentraciones de ADN, taq polimerasa, MgCl₂ y dNTPs, variando uno de los componentes de la reacción y manteniendo constante los otros (Das *et al.*, 2009).

4.2.3. Preparación de la mezcla de reacción

La reacción de amplificación inicialmente se realizó usando 1ul de ADN (10ng) en una reacción conteniendo 0.4 ul de dNTPs, 1.2 ul de MgCl₂, 0.4 ul de iniciadores, 2.5 ul de Taq ADN polimerasa, 0.5 ul de Sero-albúmina bovina, 1 ul de buffer (10 mM tris-HCl, pH 8.3, 50 mM KCl), 3 ul de agua esterilizada, en un volumen final de 10 ul.

4.2.4. Condiciones de amplificación

Las amplificaciones se realizarón para cada iniciador seleccionado, usando un programa de 40 ciclos aproximadamente por cuatro horas, bajo las siguientes condiciones: desnaturalización a 95°C por 1min, apareamiento de iniciadores a 50°C por 2min y elongación a 72°C por 5min.

Para realizar la electroforesis se añadió 6ul de tampón de carga (95% de formamida, 20 mM de EDTA, 0,05 de azul de bromofenol y 0.05 de xilen cianol) a las amplificaciones obtenidas. Las muestras fueron desnaturalizadas a 94°C por 3 minutos y cargada en un gel vertical de poliacrilamida al 6% (con 7M de úrea, catalizada con Temed y APS (persulfato de amonio)) en 1X tri-borato EDTA (TBE). La electroforesis corrió a 100 V por 2 horas.

4.3. HIPÓTESIS GENERAL

Las aguas del río Ica producen un efecto biotóxico sobre las células de los ápices radiculares de *Allium cepa*.

4.4. HIPÓTESIS ESPECÍFICAS

- El desarrollo radicular de *Allium cepa* se ve afectado por las aguas del río Ica.
- Las frecuencias de células mitóticas se modifican por acción de las aguas del río Ica.
- Las frecuencias de anomalías cromosómicas se incrementan por acción de las aguas del río Ica.
- Los marcadores moleculares RAPDs permiten evidenciar cambios cromosómicos.

4.5. VARIABLES

En el test *Allium cepa* la variable medida fue la longitud del desarrollo radicular. En la evaluación citogenética las variables estudiadas fueron las frecuencias de células mitóticas y presencia de anomalías cromosómicas. En la evaluación molecular la variable evaluada fueron los patrones de bandas (polimorfismo) de los marcadores moleculares RAPDs.

4.6. OPERACIONALIZACIÓN DE VARIABLES

Variables	Definición conceptual	Dimensiones	Indicadores
Desarrollo radicular	Longitud de las raíces expuestas a aguas del río Ica	Centímetros	Inhibición del desarrollo radicular
Frecuencia mitótica	Cantidad de células en mitosis	Fracciones	Disminución de células en mitosis
Frecuencia anomalías	Cantidad de anomalías cromosómicas	Fracciones	Aumento de anomalías
Patrón de bandas	Presencia o ausencia de bandas	Numéricas: 0 y 1	Bandas diferenciales

4.7. POBLACIÓN Y MUESTRA

Para la ejecución de experimento se utilizó *Allium cepa* (cebollas) como muestras biológicas. Las cebollas a utilizarse fueron de la misma variedad y homogéneas en peso y estado fitosanitario. La unidad experimental fue una cebolla, instalada dentro de un sistema para la aplicación del test *allium cepa*. El factor a analizar es el agua de río, en diferentes niveles (diluciones o concentraciones), para ello las muestras de agua del río Ica, fueron colectadas en tres puntos, siendo un punto obligatorio la zona adyacente a la zona urbana.

4.8. RECOLECCIÓN DE INFORMACIÓN

4.8.1. Recolección de datos del diseño experimental

La información proveniente del diseño experimental fué colectada a los 4, 8, 12 días, tomando como dato el desarrollo radicular de *Allium cepa*. Estos datos fueron registrados y almacenados en archivos excel para su posterior

análisis. Además, se tomaron y guardaron imágenes en formato JPG provenientes de cámaras fotográficas.

4.8.2. Recolección de datos del análisis citogenético

La información para el análisis citogenético consideró el muestreo aleatorio de ápices radiculares a los 4, 8, 12 días, tomando como dato la frecuencia de células mitóticas, el índice mitótico, presencia de anomalías cromosómicas u otras manifestaciones celulares. Estos datos fueron registrados y almacenados en archivos excel para su posterior análisis. Además, se tomaron y guardaron imágenes en formato JPG provenientes de cámaras fotográficas.

4.8.3. Recolección de datos del análisis molecular

La información para el análisis molecular es producto de comparar el tratamiento con mayor frecuencia de anomalías cromosómicas versus el tratamiento control. Para esto se registran las bandas polimórficas generadas, las cuales se codificaron con 1 la presencia de bandas y 0 la ausencia de bandas. Estos datos fueron registrados y almacenados en archivos excel para su posterior análisis. Además, se fotografiaron o escanearon los geles de electroforesis para ser guardadas en formato JPG provenientes de cámaras fotográficas.

4.9. ANALISIS ESTADISTICO

Una vez obtenido los datos del diseño experimental para el *test Allium*, respecto al desarrollo radicular, se procedió a verificar los supuestos del análisis de varianza (ANVA), utilizando los valores residuales de los datos, que incluyen la prueba de normalidad de Shapiro Wilk y de modo opcional mediante un gráfico de QQ-plot, y la homogeneidad de varianzas mediante la prueba de Bartlett y de modo opcional mediante un gráfico de dispersión. Luego de cumplirse estos supuestos recién se procedió a realizar el ANVA, donde se planteó las siguientes Hipótesis:

H₀: Todos los tratamientos responden de modo similar, en su desarrollo radicular.

H₁: algún tratamiento responde de modo diferente, en su desarrollo radicular.

Con una significancia de alfa = 0.05, y un nivel de confianza de 95%, se determinó si algún tratamiento respondió diferente y se procedió finalmente a realizar la comparación de medias mediante la prueba de Tukey (alfa=0.05).

De modo similar se analizó los datos correspondientes a los índices mitóticos hallados para los diferentes tratamientos.

V. ANALISIS E INTERPRETACION DE RESULTADOS

5.1. RESULTADOS DEL DISEÑO EXPERIMENTAL

El coeficiente de variación (CV) para los datos de desarrollo radicular a los 4 y 8 días, resulto mayor a 10, por tanto, el análisis de varianza (ANVA) no correspondía, del mismo modo se evaluó los supuestos que se deben cumplir antes de realizar un ANVA, encontrándose que para estas mediciones no se cumplían todos los supuestos como la normalidad y la homogeneidad de varianzas. En la última medición, día 12, del desarrollo radicular se encontró un CV de 1.21. Además, los datos de esta última medición cumplieron los supuestos de normalidad (Shapiro-Wilk, p-valor=0.07) y homogeneidad de varianzas (Bartlett, p-value = 0.97). El análisis de varianza para esta última medición resulto altamente significativa (p-valor=0.0001), con ello se procedió a realizar la comparación de medias mediante Tukey (alfa=0.05), según se muestra en la tabla 1. Se puede observar que el tratamiento control tienen un desarrollo radicular (longitud) estadísticamente diferente y mayor a los demás tratamientos. Se generó un gráfico de cajas para el desarrollo radicular de los tratamientos.

Tabla 1. Comparación de medias según Tukey (alfa=0.05), para el desarrollo radicular.

Tratamiento	Medias	Grupo
control	9.30	A
rio_A1	9.05	B
rio_A2	8.95	B
rio_B1	8.30	C
rio_A3	8.30	C
rio_B2	7.90	D
rio_B3	7.13	E
rio_C1	7.05	E
rio_C2	6.30	F
rio_C3	4.60	G

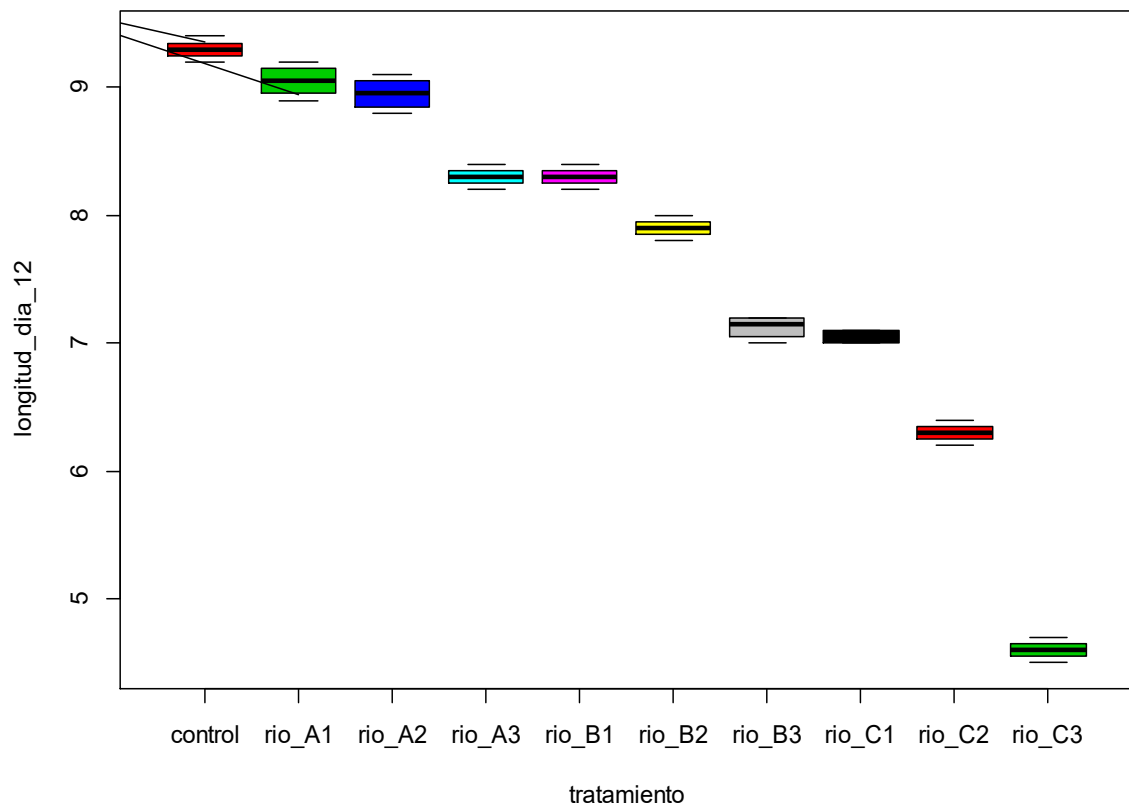


Figura 1. Gráfico de cajas para el desarrollo radicular de los diferentes tratamientos (aguas de río, en 3 diluciones). Grafico generado con el software libre R.

5.2. RESULTADOS DEL ANALISIS CITOGENETICO

El coeficiente de variación (CV) para los datos de índice mitótico obtenidos a los 4 y 8 días, resultaron superiores a 10, por tanto, el análisis de varianza (ANVA) no correspondía. En la última medición, día 12, para los valores del índice mitótico de los diferentes tratamientos se encontró un CV de 1.82. Además, los datos de esta última medición cumplieron los supuestos de normalidad (Shapiro-Wilk, p-valor=0.41) y homogeneidad de varianzas (Bartlett, p-value = 0.76). El análisis de varianza para esta última medición resulto altamente significativa (p-valor=0.0001), con ello se procedió a realizar la comparación de medias mediante Tukey (alfa=0.05), según se muestra en la tabla 2. Se generó un gráfico de cajas para visualizar los índices mitóticos de los tratamientos. Se configuro una tabla resumen de la cantidad de anomalías citogenéticas observadas en los diferentes tratamientos (tabla 3).

Tabla 2. Comparación de medias según Tukey (alfa=0.05) para los índices mitóticos.

Tratamiento	Medias	Grupo
control	17.6	A
rio_A1	16.1	B
rio_A2	15.9	B
rio_B1	13.6	C
rio_A3	13.6	C
rio_B2	11.8	D
rio_B3	9.25	E
rio_C1	9.1	E
rio_C2	6.6	F
rio_C3	3.2	G

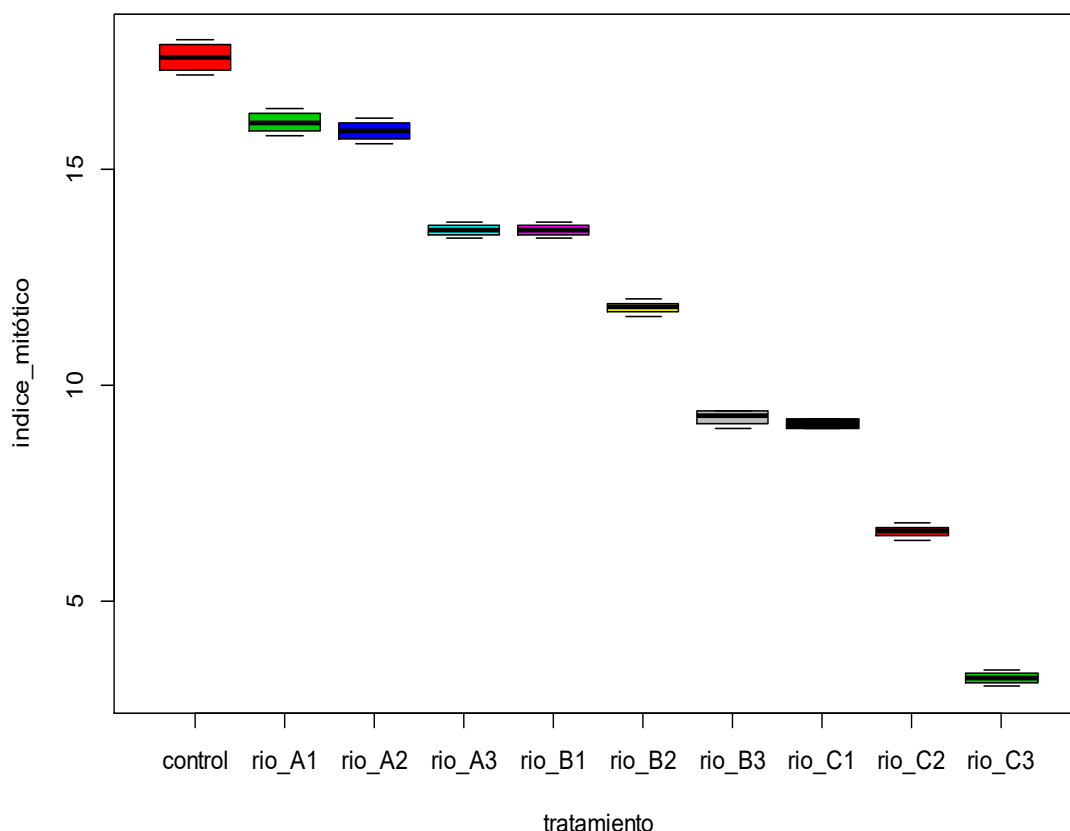


Figura 2. Gráfico de cajas para el índice mitótico de los diferentes tratamientos (aguas de río, en 3 diluciones). Grafico generado con el software libre R.

Tabla 3. Datos obtenidos a partir del análisis citogenético, luego de analizar un total de 19456 células.

Tratamiento	Mitosis	Interfase	C-mitosis	Puente anafásico	Citotoxicidad	N°_células
control	17.6	82.4	0	0	0	1900
rio_A1	16.1	83.9	0	0	0	1976
rio_A2	15.9	84.1	1	0	0	2008
rio_A3	13.6	86.4	1	0	1	1860
rio_B1	13.6	86.4	0	0	3	1990
rio_B2	11.8	88.2	4	1	37	1966
rio_B3	9.25	90.75	5	1	69	1942
rio_C1	9.1	90.9	3	2	9	2002
rio_C2	6.6	93.4	4	2	73	1882
rio_C3	3.2	96.8	1	0	159	1930
Total						19456

5.3. RESULTADOS DEL ANALISIS MOLECULAR

La extracción del ADN realizado a las muestras de raíz expuestas a los diferentes tratamientos, resulto de alta calidad y cantidad (mayor a 50 ng/ul). Considerando que la disminución del desarrollo radicular y ocurrencia de anomalías cromosómicas está asociado directamente a efectos genotoxicos que impactan directamente sobre la división celular. Además, las diferentes anomalías cromosómicas observadas pueden estar asociados a una mutación generada por la presencia de compuestos biotóxicos, que potencialmente pueden detectarse mediante el uso del marcador molecular RAPD. Según el análisis realizado usando RAPD se logra identificar un candidato a regiones génica afectada por la exposición de células de cebolla a compuestos biotóxico, como se muestra en la figura 3.

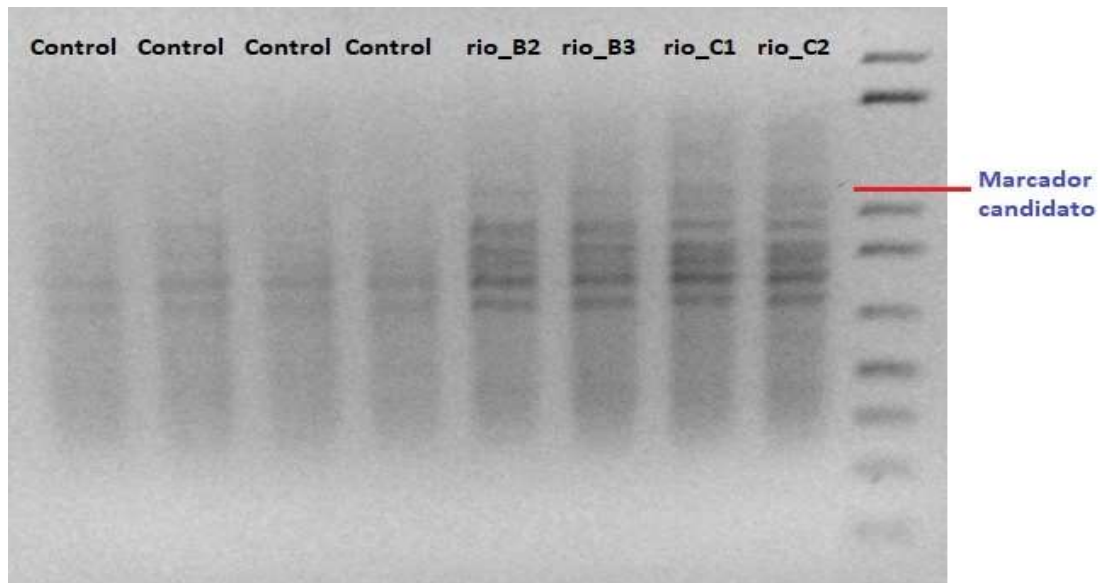


Figura 3. Banda polimórfica identificada, usando el iniciador RAPDalf5, observada solo en muestras expuestas a posibles agentes biotóxico presentes a agua del rio. Marcador Molecular 1 KbPlus.

VI. DISCUSION DE RESULTADOS

El coeficiente de variación (CV) superior a 10, para los datos de desarrollo radicular a los 4 y 8 días, indica que posiblemente los ápices radiculares van respondiendo de modo paulatino a los agentes contaminantes y además el proceso de rehidratación de las yemas radiculares varía en función al estado fisiológico de la cebolla, si bien se trató de asegurar unidades experimentales homogéneas, es complicado poder controlar cuestiones fisiológicas internas de la cebolla (Bonciu et al., 2018). La medición del CV al día 12 de desarrollo radicular para los diferentes tratamientos evaluados, fue de 1.21 lo que supone que en este punto los tratamientos acentuaron su efecto sobre las unidades experimentales, se entiende que el efecto sostenido en el tiempo de los contaminantes termina por uniformizarse dentro de un mismo tratamiento (Berrocal et al., 2013; Bonciu et al., 2018), con lo cual el CV se redujo, y consecuentemente se cumplieron los supuestos del análisis de varianza, como la normalidad (Shapiro-Wilk, p-valor=0.07) y la homogeneidad de varianzas (Bartlett, p-value = 0.97). El análisis de varianza (ANVA) para el día 12 resulto

altamente significativa (p -valor=0.0001), y luego de realizar la comparación de medias mediante Tukey (α =0.05) (ver tabla 1), se observa que el tratamiento control tiene un desarrollo radicular mayor, seguido de los tratamientos rio_A1 y rio_A2 que corresponden a aguas de río usados en el riego de cultivo. El tratamiento rio_C3 corresponden a agua de río adyacente a zonas urbanas, con mucha turbidez, lo que implica la presencia de detergentes, agentes tóxicos, agentes microbianos, desechos orgánicos e inorgánicos entre otros compuestos (Bagatini et al., 2009; Christofolletti et al., 2013; Leme & Marin-Morales, 2009; Rank & Nielsen, 1993). Claramente se puede observar que conforme el agua de río sigue su curso y se aleja de las zonas urbanas, va sedimentando compuestos tóxicos y agentes inhibitorios de la división celular. Los cuerpos de aguas, como los ríos, tienen la capacidad de ir purificándose de modo natural conforme avanzan en su cauce, acá también influye la apertura de canales de riego que se llevan volúmenes de agua hacia los campos de cultivo, en ese desvío la corriente de agua se encuentra con suelos de otras características, posiblemente con mayor capacidad de atrapar o filtrar compuestos contaminantes, de modo tal que llegan con menos contaminantes a los campos de cultivo, sin embargo, en caso transportar algún agente altamente tóxico o patogénico son un peligro latente, que en bajas cantidades podrían atentar contra la salud de los seres pobladores (Bagatini et al., 2009).

De modo similar, se monitoreo el índice mitótico de los tratamientos a los 4 y 8 días, y al evaluar sus CV, se observó que estos fueron mayores a 10. Esto se vio expresado claramente también en la evaluación del desarrollo radicular, según se indicó previamente. Luego de realizar la medición de los índices mitóticos en el día 12, se observó un CV de 1.82 correspondiente a los diferentes tratamientos, lo que consecuentemente permitió evaluar los supuestos del ANVA como la normalidad (Shapiro-Wilk, p -valor=0.41) y la homogeneidad de varianzas (Bartlett, p -value = 0.76), en ambos casos fueron satisfactorios. El ANVA de los índices mitóticos de los distintos tratamientos resulto altamente significativo (p -valor=0.0001), y con ello se procedió a realizar la comparación de medias mediante Tukey (α =0.05) (ver tabla 2), evidenciándose que el tratamiento control fue

mayor y estadísticamente diferente respecto a todos los demás tratamientos, similar a otros estudios (Berrocal et al., 2013; Cabuga Jr. et al., 2017; Konuk et al., 2007), y el peor tratamiento fue rio_C3 (agua de río adyacente a zonas urbanas), lo que evidencia un alto nivel de inhibición de la mitosis, correspondiéndose con un menor desarrollo radicular, según lo mencionado previamente. Estos valores de índices mitóticos también pueden convertirse en valores porcentuales de inhibición mitótica (Evseeva et al., 2003; Liman et al., 2011; Muñoz-solarte & Guerrero-pepinosa, 2013; Samuel et al., 2010), con ello podemos indicar que el nivel más alto de inhibición mitótica fue de 81.81% correspondiente al tratamiento rio_C3 (agua de río adyacente a zonas urbanas) y la menor inhibición fue de 8.5% correspondiente al tratamiento rio_A1 (agua de riego diluida).

Al evaluar los niveles de citotoxicidad, resultó que el tratamiento control y los tratamientos correspondientes a agua de riego, tenían un nivel de citotoxicidad similar a cero, y los tratamientos de agua de río adyacente a zonas urbanas tenían los niveles más altos de citotoxicidad, siendo el tratamiento rio_C3 el que presentó la mayor citotoxicidad e igual a 8.2% del total de células evaluadas para este tratamiento (1930 células). La genotoxicidad pudo ser analizada gracias a que *Allium cepa* permite evidenciar la presencia de anomalías o daños cromosómicos (Bosio & Laughinghouse IV, 2012), en este sentido se observó que la presencia de puentes anafásicos no fue frecuente, posiblemente por los altos niveles de citotoxicidad (Chakraborty et al., 2009; Mustafa & Suna Arikan, 2008; Rank & Nielsen, 1993), observándose una frecuencia máxima de 0.1% para los tratamientos rio_C1 y rio_C2. Por otro lado, la c-mitosis estuvo presente en todos los tratamientos con agua de río, esto ya reportado por otros estudios, donde lo señalan como la anomalía más frecuente en ensayos de genotoxicidad (Akinboro & Bakare, 2007; Bosio & Laughinghouse IV, 2012; Datta et al., 2018; Tartar et al., 2006). Podemos indicar que la toxicidad global fue de 1.8 %, la presencia de puentes anafásicos global fue de 0.03%, y la presencia de c-mitosis global fue de 0.1%.

La extracción del material genético (ADN) realizado a las muestras de raíz expuestas a los diferentes tratamientos, resultó de alta calidad y cantidad (mayor a 50 ng/ul). Considerando que la disminución del desarrollo

radicular y ocurrencia de anomalías cromosómicas está asociado directamente a efectos genotóxicos que impactan directamente sobre la división celular. Además, las diferentes anomalías cromosómicas observadas pueden estar asociados a una mutación generada por la presencia de compuestos biotóxicos, que potencialmente pueden detectarse mediante el uso del marcador molecular RAPD (Barakat et al., 2010; Hofmann et al., 2004). Luego de probar 6 iniciadores arbitrarios (Iniciadores para RAPDs), se observó que solo un primer generaba una banda polimórfica, que logra identificar una región génica candidata a haber sido afectada por la exposición de células de cebolla a compuestos biotóxico (figura 3). Estos resultados son interesantes ya que no hay un estudio similar que complemente la aplicación del test *Allium* con el uso del marcador molecular RAPD. La identificación de esta banda polimórfica, sería motivo de estudiarlo, si se trata de una región sensible a agentes mutagénicos o fue una mutación al azar, que podría afectar a regiones de interés para un cultivo de importancia económica, además esta mutación podría acumularse y ser heredable(Leme & Marin-Morales, 2009).

VII. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

- El CV para el día 12 de desarrollo radicular de los diferentes tratamientos, fue de 1.21 lo que supone que en este punto los tratamientos acentuaron su efecto sobre las unidades experimentales.
- El tratamiento control tiene un desarrollo radicular mayor, seguidos de los tratamientos rio_A1 y rio_A2 que corresponden a aguas de río usados en el riego de cultivos.
- El nivel más alto de inhibición mitótica fue de 81.81% correspondiente al tratamiento rio_C3 (agua de río adyacente a zonas urbanas) y la menor inhibición fue de 8.5% correspondiente al tratamiento rio_A1 (agua de riego diluida).
- Los tratamientos de agua de río adyacente a zonas urbanas tenían los niveles más altos de citotoxicidad, teniendo al tratamiento rio_C3 con la mayor citotoxicidad de 8.2%.
- La presencia de puentes anafásicos no fue frecuente, posiblemente por los altos niveles de citotoxicidad, observándose una frecuencia máxima de 0.1% para los tratamientos rio_C1 y rio_C2. Por otro lado, la c-mitosis estuvo presente en todos los tratamientos excepto en el control.
- Podemos indicar que los niveles generales de toxicidad, presencia de puentes anafásicos y c-mitosis fue de 1.8 %, 0.03%, y 0.1%, respectivamente.
- Luego de probar 6 iniciadores arbitrarios (Iniciadores para RAPDs), se observó que solo un primer (RAPDalf5.) generaba una banda polimórfica, que identifica una región génica candidata a haber ver sido afectada por compuestos biotóxico
- Los resultados son interesantes ya que no hay un estudio similar que complemente la aplicación del test *Allium* con el uso del marcador molecular RAPD.
- Se recomienda estudiar y explorar más la ocurrencia de polimorfismos asociados a agentes biotóxico, ya que estos pueden afectar directamente a genes de interés agrícola, que podrían afectar el rendimiento o calidad.

VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

Akinboro, A., & Bakare, A. A. (2007). Cytotoxic and genotoxic effects of aqueous extracts of five medicinal plants on *Allium cepa* Linn. *Journal of Ethnopharmacology*, 112(3), 470–475. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2007.04.014>

Aksoy, Ö. (2017). Detection of Environmental Mutagens Through Plant Bioassays. *Plant Ecology - Traditional Approaches to Recent Trends*, September. <https://doi.org/10.5772/intechopen.69274>

Azofeita-delgado, Á. (2006). Uso De Marcadores Moleculares En Plantas ; *Agronomía Mesoamericana*, 17(2), 221–242. <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=43717210%0Ahttp://www.redalyc.org/articulo.oa?id=43711209>

Bagatini, M. D., Vasconcelos, T. G., Laughinghouse IV, H. D., Martins, A. F., & Tedesco, S. B. (2009). Biomonitoring hospital effluents by the *Allium cepa* L. test. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 82(5), 590–592. <https://doi.org/10.1007/s00128-009-9666-z>

Barakat, M. N., Abdel Fattah, R. S., Badr, M., & El-Torky, M. G. (2010). In vitro mutagenesis and identification of new variants via RAPD markers for improving *Chrysanthemum morifolium*. *African Journal of Agricultural Research*, 5(8), 748–757. <https://doi.org/10.5897/AJAR09.679>

Barbério, A., Barros, L., Voltolini, J. C., & Mello, M. L. S. (2009). Evaluation of the cytotoxic and genotoxic potential of water from the River Paraíba do Sul, in Brazil, with the *Allium cepa* L. test. *Brazilian Journal of Biology*, 69(3), 837–842. <https://doi.org/10.1590/s1519-69842009000400010>

Berrocal, A., Blas, R., Flores Rivas, J., & Siles Vallejos, M. (2013). Evaluación del potencial mutagénico de biocidas (vertimec y pentacloro) sobre cebolla. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 15(1), 17–27.

Bonciu, E., Firbas, P., Fontanetti, C. S., Wusheng, J., Karaismailoğlu, M. C., Liu, D., Menicucci, F., Pesnya, D. S., Popescu, A., Romanovsky, A. V., Schiff, S., Ślusarczyk, J., de Souza, C. P., Srivastava, A., Sutan, A., & Papini, A. (2018). An evaluation for the standardization of the *Allium cepa* test as cytotoxicity and genotoxicity assay. *Caryologia*, 71(3), 191–209. <https://doi.org/10.1080/00087114.2018.1503496>

Bosio, S., & Laughinghouse IV, H. D. (2012). Bioindicator of Genotoxicity: The *Allium cepa* Test. *Environmental Contamination*. <https://doi.org/10.5772/31371>

Cabuga Jr., C. C., Abelada, J. J. Z., Apostado, R. R. Q., Hernando, B. J. H., Lador, J. E. C., Obenza, O. L. P., Presilda, C. J. R., & Havana, H. C. (2017). *Allium cepa* test: An evaluation of genotoxicity. *Proceedings of the International Academy of Ecology and Environmental Sciences*, 7(1), 12–

19. [http://www.iaees.org/publications/journals/piaees/articles/2017-7\(1\)/Allium-cepa-test-An-evaluation-of-genotoxicity.pdf](http://www.iaees.org/publications/journals/piaees/articles/2017-7(1)/Allium-cepa-test-An-evaluation-of-genotoxicity.pdf)

Chakraborty, R., Mukherjee, A. K., & Mukherjee, A. (2009). Evaluation of genotoxicity of coal fly ash in *Allium cepa* root cells by combining comet assay with the *Allium* test. *Environmental Monitoring and Assessment*, 153(1–4), 351–357. <https://doi.org/10.1007/s10661-008-0361-z>

Christofolletti, C. A., Pedro-Escher, J., & Fontanetti, C. S. (2013). Assessment of the genotoxicity of two agricultural residues after processing by diplopods using the *Allium cepa* assay. *Water, Air, and Soil Pollution*, 224(4). <https://doi.org/10.1007/s11270-013-1523-3>

Das, B. K., Jena, R. C., & Samal, K. C. (2009). Optimization of DNA isolation and PCR protocol for RAPD analysis of banana/plantain (*Musa* spp.). *International Journal of Agriculture Sciences*, 1(2), 21.

Datta, S., Singh, J., Singh, J., Singh, S., & Singh, S. (2018). Assessment of genotoxic effects of pesticide and vermicompost treated soil with *Allium cepa* test. *Sustainable Environment Research*, 28(4), 171–178. <https://doi.org/10.1016/j.serj.2018.01.005>

Doyle, J. J., & Doyle, J. L. (1990). Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus*, 12(13), 39-40.

Evseeva, T. I., Geras'kin, S. A., & Shuktomova, I. I. (2003). Genotoxicity and toxicity assay of water sampled from a radium production industry storage cell territory by means of *Allium*-test. *Journal of Environmental Radioactivity*, 68(3), 235–248. [https://doi.org/10.1016/S0265-931X\(03\)00054-7](https://doi.org/10.1016/S0265-931X(03)00054-7)

Hofmann, N. E., Raja, R., Nelson, R. L., & Korban, S. S. (2004). Mutagenesis of embryogenic cultures of soybean and detecting polymorphisms using RAPD markers. *Biologia Plantarum*, 48(2), 173–177. <https://doi.org/10.1023/B:BIOP.0000033441.46242.94>

Konuk, M., Lıman, R., & Cığerclı, İ. H. (2007). Determination of Genotoxic Effect of Boron. *Science*, 39(1), 73–79.

Kumari, M., Mukherjee, A., & Chandrasekaran, N. (2009). Genotoxicity of silver nanoparticles in *Allium cepa*. *Science of the Total Environment*, 407(19), 5243–5246. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2009.06.024>

Leme, D. M. (2010). Avaliação da genotoxicidade e mutagenicidade de misturas comerciais de diesel e biodiesel puras e em simulações de vazamento em água e solo. *Aleph*, 207 f. : il., tabs.

Leme, D. M., & Marin-Morales, M. A. (2009). *Allium cepa* test in environmental monitoring: A review on its application. *Mutation Research - Reviews in Mutation Research*, 682(1), 71–81. <https://doi.org/10.1016/j.mrrev.2009.06.002>

- Liman, R., Akyil, D., Eren, Y., & Konuk, M. (2010). Testing of the mutagenicity and genotoxicity of metolcarb by using both Ames/Salmonella and Allium test. *Chemosphere*, 80(9), 1056–1061. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2010.05.011>
- Liman, R., Ciğerci, I. H., Akyil, D., Eren, Y., & Konuk, M. (2011). Determination of genotoxicity of Fenaminosulf by Allium and Comet tests. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 99(1), 61–64. <https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2010.10.006>
- Muñoz-solarte, D. M., & Guerrero-pepinosa, N. (2013). Allium test para evaluar el efecto citotóxico y genotóxico de extractos naturales en células meristemáticas de Allium cepa. *Memorias*, 11(19), 83–86. <https://doi.org/10.16925/me.v11i19.112>
- Mustafa, Y., & Suna Arıkan, E. (2008). Genotoxicity testing of quizalofop-P-ethyl herbicide using the allium cepa anaphase-telophase chromosome aberration assay. *Caryologia*, 61(1), 45–52. <https://doi.org/10.1080/00087114.2008.10589608>
- Ping, K. Y., Darah, I., Yusuf, U. K., Yeng, C., & Sasidharan, S. (2012). Genotoxicity of euphorbia hirta: An allium cepa assay. *Molecules*, 17(7), 7782–7791. <https://doi.org/10.3390/molecules17077782>
- Radić, S., Stipaničev, D., Vujčić, V., Rajčić, M. M., Širac, S., & Pevalek-Kozlina, B. (2010). The evaluation of surface and wastewater genotoxicity using the Allium cepa test. *Science of the Total Environment*, 408(5), 1228–1233. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2009.11.055>
- Rank, J., & Nielsen, M. H. (1993). A Modified Allium Test as a Tool in the Screening of the Genotoxicity of Complex Mixtures. *Hereditas*, 118(1), 49–53. <https://doi.org/10.1111/j.1601-5223.1993.t01-3-00049.x>
- Samuel, O. B., Osuala, F. I., & Odeigah, P. G. C. (2010). Cytogenotoxicity evaluation of two industrial effluents using Allium cepa assay. *African Journal of Environmental Science and Technology*, 4(1), 21–27.
- Tartar, G., Kaymak, F., & Muranli, F. D. G. (2006). Genotoxic effects of avenoxan on allium cepa L. and allium sativum L. *Caryologia*, 59(3), 241–247. <https://doi.org/10.1080/00087114.2006.10797921>
- Türkoğlu, Ş. (2007). Genotoxicity of five food preservatives tested on root tips of Allium cepa L. *Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 626(1–2), 4–14. <https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2006.07.006>
- Williams, J. G. K., Reiter, R. S., Young, R. M., & Scolnik, P. A. (1993). Genetic mapping of mutations using phenotypic pools and mapped RAPD markers. *Nucleic Acids Research*, 21(11), 2697–2702. <https://doi.org/10.1093/nar/21.11.2697>

Yunus, M. F., Aziz, M. A., Kadir, M. A., Daud, S. K., & Rashid, A. A. (2013). In vitro mutagenesis of *Etilingera elatior* (Jack) and early detection of mutation using RAPD markers. *Turkish Journal of Biology*, 37(6), 716–725. <https://doi.org/10.3906/biy-1303-19>

IX. ANEXOS

Tabla 4. Base de datos del diseño experimental

Tratamiento	Longitud_dia_12	%_Inhibición	Indice_Mitótico
control	9.2	1	17.2
control	9.4	1	17.4
control	9.3	0	18
control	9.3	0	17.8
rio_A1	9	3.2	16
rio_A1	9.1	2.2	16.2
rio_A1	9.2	1.1	16.4
rio_A1	8.9	4.3	15.8
rio_A2	8.9	4.3	15.8
rio_A2	8.8	5.4	15.6
rio_A2	9.1	2.2	16.2
rio_A2	9	3.2	16
rio_A3	8.3	10.8	13.6
rio_A3	8.4	9.7	13.8
rio_A3	8.3	10.8	13.6
rio_A3	8.2	11.8	13.4
rio_B1	8.4	9.7	13.8
rio_B1	8.3	10.8	13.6
rio_B1	8.2	11.8	13.4
rio_B1	8.3	10.8	13.6
rio_B2	7.9	15.1	11.8
rio_B2	8	14.0	12
rio_B2	7.9	15.1	11.8
rio_B2	7.8	16.1	11.6
rio_B3	7.2	22.6	9.4
rio_B3	7.2	22.6	9.4
rio_B3	7.1	23.7	9.2
rio_B3	7	24.7	9
rio_C1	7.1	23.7	9.2
rio_C1	7	24.7	9
rio_C1	7.1	23.7	9.2
rio_C1	7	24.7	9
rio_C2	6.3	32.3	6.6
rio_C2	6.4	31.2	6.8
rio_C2	6.2	33.3	6.4
rio_C2	6.3	32.3	6.6
rio_C3	4.5	51.6	3
rio_C3	4.6	50.5	3.2
rio_C3	4.7	49.5	3.4
rio_C3	4.6	50.5	3.2