

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PRODUÇÃO VEGETAL**

PAULA MAURI BERNARDES

**PROSPECÇÃO DE TOXICIDADE DE FUNGICIDAS POR ANÁLISES
MACROSCÓPICAS, MICROSCÓPICAS E MOLECULARES EM *Allium cepa***

**ALEGRE
2014**

PAULA MAURI BERNARDES

**PROSPECÇÃO DE TOXICIDADE DE FUNGICIDAS POR ANÁLISES
MACROSCÓPICAS, MICROSCÓPICAS E MOLECULARES EM *Allium cepa***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Produção Vegetal do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Espírito Santo, como requisito para a obtenção do título de *Magister Scientiae* em Produção Vegetal, na área de concentração de Biotecnologia e Ecofisiologia do Desenvolvimento de Plantas.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Marcia Flores da Silva Ferreira

**ALEGRE
2014**

Dados Internacionais de Catalogação-na-publicação (CIP)
(Biblioteca Setorial de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Espírito Santo, ES,
Brasil)

B522p Bernardes, Paula Mauri, 1987-
Prospecção de toxicidade de fungicidas por análises macroscópicas,
microscópicas e moleculares em *Allium cepa* / Paula Mauri Bernardes. – 2014.
69 f. : il.

Orientadora: Marcia Flores da Silva Ferreira.

Coorientadores: Adésio Ferreira; Larissa Fonseca Andrade.

Dissertação (Mestrado em Produção Vegetal) – Universidade Federal do
Espírito Santo, Centro de Ciências Agrárias.

1. Produtos químicos agrícolas. 2. Mutagenicidade. 3. Citogenética. 4.
Marcadores moleculares. I. Ferreira, Marcia Flores da Silva. II. Ferreira,
Adésio. III. Andrade, Larissa Fonseca. IV. Universidade Federal
do Espírito Santo. Centro de Ciências Agrárias. V. Título.

CDU: 63

PAULA MAURI BERNARDES

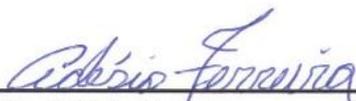
**PROSPECÇÃO DE TOXICIDADE DE FUNGICIDAS POR ANÁLISES
MACRÓSCOPICAS, MICRÓSCOPICAS E MOLECULARES EM *Allium cepa***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Produção Vegetal do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Espírito Santo, como requisito para a obtenção do título de *Magister Scientiae* em Produção Vegetal, na área de concentração de Biotecnologia e Ecofisiologia do Desenvolvimento de Plantas.

Aprovada em 28 de FEVEREIRO de 2014.



Prof.^a. Dr.^a. Marcia Flores da Silva Ferreira
CCA – UFES (Orientadora)



Prof. Dr. Adésio Ferreira
CCA – UFES (Co-orientador)



Prof.^a. Dr.^a. Larissa Fonseca Andrade-Vieira
UFLA (Co-orientadora)



Prof.^a. Dr.^a. Milene Miranda Praça Fontes
CCA – UFES (Membro externo)

Em especial, a minha mãe Carolina da Glória Mauri

Ao meu irmão, José Eduardo Mauri Bernardes

Ao meu pai, Paulo Sérgio Bernardes

A minha vó, Tereza Rotta Mauri

DEDICO

*“O saber a gente aprende com os mestres e com os livros.
A sabedoria, se aprende é com a vida e com os humildes.” Cora Coralina”*

“Tudo parece impossível até que seja feito.” Nelson Mandela

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, por me dá forças e sabedoria para lidar com as dificuldades.

À Universidade Federal do Espírito Santo e ao Programa de Pós Graduação em Produção Vegetal, pela oportunidade de realizar a minha pesquisa. À secretária Madalena, pelas informações concedidas durante esses 2 anos.

A minha mãe, por sempre estar ao meu lado me dando força, ânimo, carinho e me impulsionando a seguir em frente e ir em busca dos meus sonhos. Ao meu irmão, por me ajudar quando precisei. Ao meu pai por me ajudar sempre.

A minha vó, vô, tios, tias, primos, primas, padrinho e madrinha, por estarem ao meu lado e por acreditarem em mim.

À Professora Marcia, por ter aceitado a me orientar, pelos conhecimentos passados, conselhos e por ter paciência e dedicação nas horas que precisei.

Ao Professor Adésio, pelos conselhos e conversas sempre que necessários, por ter paciência em me ensinar estatística.

À Professora Larissa, por ter aceitado a me coorientar e pelo conhecimento que me foi dado.

A meus irmãos, Zé Henrique, Tiago, Angélica, Luina, Paula, Wagner e Sara, pelos momentos de alegria e de diversão no laboratório, por sempre me ouvirem quando mais precisava. A todos do Laboratório de Genética e Melhoramento.

Aos meus amigos Abel, Ludimyla, Rafael, Caroline, Geovana, Anelise, Micheli, Liana, Lilian, Vinicius, Kharen, Sara Maria, José Dias, Verônica, Rodrigo, Josimar, Kati, e aos demais que conheci durante esse período, pela força e descontração na sala de estudos.

Em especial, à minha prima Tereza, amiga Carol, ao Abel, Wagner, Bruno e a Fran, que me ajudaram a montar e desmontar meus experimentos.

Biografia

PAULA MAURI BERNARDES, filha de Carolina da Glória Mauri e Paulo Sérgio Bernardes, nasceu em 07 de setembro de 1987, na cidade de Alegre, Estado do Espírito Santo. Concluiu o ensino médio no Instituto Educacional Santos Carvalheira em Alegre. Em 2007, ingressou no curso de Agronomia no Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Espírito Santo, graduou-se em fevereiro de 2012, recebendo o título de Bacharel em Agronomia. Em março de 2012, ingressou no Mestrado pelo Programa de Pós Graduação em Produção Vegetal no Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Espírito Santo, na área de Biotecnologia e Ecofisiologia do Desenvolvimento de Plantas.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	10
2. REVISÃO DE LITERATURA	12
2.1. TOXICIDADE E MÉTODOS DE DETECÇÃO	12
2.2. AGROTÓXICOS.....	15
2.2.1. Grupo químico Dicarboximida	17
2.2.2. Grupo químico Triazol.....	18
2.3. MARCADORES MOLECULARES EM TOXICOLOGIA.....	19
3. OBJETIVOS.....	22
3.1. Objetivo Geral	22
3.2. Objetivos Específicos.....	22
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	23
4.3. Soluções	23
4.4. Análise Macroscópica	25
4.5. Análise Microscópica.....	26
4.6. Análises Moleculares	26
5. RESULTADOS	30
5.1. Macroscópicos e Microscópicos.....	30
5.2. Marcadores Moleculares	33
6. DISCUSSÃO.....	40
7. CONCLUSÃO.....	48
8. REFERÊNCIAS	49

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1. Classificação das amostras estudadas pela ANVISA segundo a presença ou ausência de resíduos de agrotóxicos nos alimentos avaliados. (Fonte: PARA, 2011) ... 16
- Figura 2. Grupos químicos que apresentaram elevadas quantidades de resíduos nas amostras insatisfatórias no ano de 2011. (Fonte PARA 2011, 2012) 17
- Figura 3. Grupos químicos que apresentaram elevadas quantidades de resíduos nas amostras insatisfatórias no ano de 2012. (Fonte PARA 2011, 2012) 17
- Figura 4. Alterações aneugênicas/ clastogênicas encontradas em maior frequência em células meristemáticas de *Allium cepa* quando submetidas aos tratamentos com os princípios ativos difenoconazol, tebuconazol, procimidona e iprodiona. A: c-metáfase; B: c-metáfase poliplóide; C: cromossomo perdido..... 33
- Figura 5. Perfil de DNA obtido das células de *Allium cepa* submetidas aos princípios ativos difenoconazol (D), tebuconazol (T), procimidona (P) e iprodiona (I) nas cinco concentrações, respectivamente, e para os controles negativo (Co-) e positivo (Co+). . 34
- Figura 6. Agrupamento UPGMA de DNAs tratados com diferentes princípios ativos, obtidos de distâncias genéticas e de dissimilaridade para os primers ISSR e SSR. A e E: difenoconazol; B e F: tebuconazol; C e G: procimidona; D e H: iprodiona. 39

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Descrição dos quatro fungicidas e de seus princípios ativos	24
Tabela 2. Concentração ($\mu\text{g/mL}$) dos princípios ativos dos fungicidas utilizados.....	25
Tabela 3. Sequência dos primers oriundos de ESTs e natureza das repetições das Sequências Simples Repetitivas (SSR) e Inter Sequência Simples Repetitivas (ISSR). 29 N: A, G, C, T; Y: C, T; H: A, T, C; B: T, C, G; V: A, C, G; D: A, T, G.....	29
Tabela 4. Parâmetros macroscópicos e microscópicos, avaliados em sementes de <i>Allium cepa</i> tratadas com os princípios ativos difenoconazol, tebuconazol, procimidona e iprodiona, com cinco concentrações cada, e controles negativo (água destilada) e positivo (trifluralina)	32
Tabela 5. Análise geral das alterações observadas em relação ao total de células de <i>Allium cepa</i> analisadas para os princípios ativos e os controles, para porcentagem de cromossomo perdido; cromossomo quebrado; cromossomo pegajoso; c-metáfase; ponte e c-metáfase poliploide, respectivamente.....	33
Tabela 6. Análise geral de ganhos, perdas e intensidade de bandas em relação ao controle negativo de cada princípio ativo com marcador ISSR e SSR.....	35
Tabela 7. Dissimilaridade, obtidas com os ISSR, e distância genética, obtidas com SSR, dos tratamentos de DNAs expostos a diferentes concentrações de quatro princípios ativos e os controles negativo (Co-) e positivo (Co+)	37

RESUMO

Apesar dos benefícios econômicos dos agrotóxicos para a agricultura, os efeitos negativos à saúde humana e ao meio ambiente são questionados. Dentre os agroquímicos que são usados na agricultura, destacam-se os fungicidas, que são utilizados em grande quantidade nas lavouras para controle de doenças. Com intuito de verificar os danos ocasionados por esses compostos, diversos métodos de avaliação têm sido utilizados na análise de toxicidade e mutagenicidade dos agrotóxicos. As análises macroscópicas (germinação e crescimento radicular) e microscópicas (índice mitótico, aberrações cromossômicas e nucleares) são importantes na determinação da toxicidade de compostos lançados ao meio ambiente, porque permite averiguar danos na germinação, no desenvolvimento da plântula e no ciclo celular. No entanto, para melhor compreensão dos mecanismos moleculares da mutação e de seus efeitos sobre a população exposta à contaminação ambiental, os marcadores moleculares oferecem perspectivas, por medir o efeito direto da exposição sobre o DNA. O objetivo do trabalho foi avaliar o potencial tóxico dos fungicidas por análises macroscópicas, microscópicas e moleculares em *Allium cepa*. Os resultados indicam redução nos parâmetros de germinação, crescimento radicular e índice mitótico nas maiores concentrações para os princípios ativos difenoconazol, tebuconazol, procimidona e iprodiona, quando comparados ao controle negativo, mostrando que os princípios apresentaram efeito genotóxico, citotóxico, fitotóxico para as raízes de *Allium cepa* pela alta frequência de aberrações cromossômicas, nucleares e redução do índice mitótico. Os resultados moleculares indicaram mudança no perfil de amplificação dos *primers* SSR (*Sequência Simples Repetitiva*) e o ISSR (*Inter Sequência Simples Repetitiva*), após a exposição do *Allium cepa* aos princípios ativos, incluindo alterações na perda, ganho e mudança na intensidade de banda. A perda e o ganho de bandas aconteceram à medida que aumentou a concentração dos princípios ativos. O método de agrupamento e as distâncias e dissimilaridades mostraram relação de dose-dependência, pois conseguiu separar as maiores concentrações do controle negativo para os princípios ativos no ISSR e SSR, com exceção dos princípios procimidona e iprodiona no SSR. Esses dados indicam que possui relação entre as análises utilizadas, sendo indicadores confiáveis para detectar alterações por substâncias químicas. Os marcadores moleculares ISSR e SSR são ferramentas eficientes em avaliar alterações ocasionadas no DNA por fungicidas podendo ser utilizada em estudos de toxicidade.

Palavras- chave: mutagenicidade, SSR, ISSR, citogenética

ABSTRACT

Despite the economic benefits of agrotoxics to agriculture, the negative effects to human health and to the environment are questioned. Among the agrochemicals that are used in agriculture, the fungicides, which are used in elevated quantity in the fields to control diseases, are detached. Aiming to verify the damage caused by these compounds, several evaluation methods have been used on agrotoxics toxicity and mutagenicity analyses. The macroscopic (germination and radicular growing) and microscopic analyses (mitotic index, chromosome and nuclear aberrations) are important on toxicity determination of the compounds which are threw into the environment, because it allows to investigate damage on germination, on plantlets development and on nuclear cycle. However, for better understanding of the molecular mechanisms of mutation and of their effects upon the population exposed to environment contamination, the molecular markers offer perspectives, for measuring the direct effect of exposition upon DNA. The objective of the work was to evaluate fungicides toxic potential by macroscopic, microscopic and molecular analyses in *Allium cepa*. The results indicate reduction on germination parameters, radicular growing and mitotic index on higher concentrations for the active principles difeconazole, tebuconazole, procimidone and iprodione, when compared to negative control, showing that the principles presented genotoxic, cytotoxic, fitotoxic effects for *Allium cepa* roots by the high frequency of chromosome, nuclear aberrations and mitotic index reduction. The molecular results indicated change on the profile of the SSR (Single Simple Repeat) and the ISSR (Inter Simple Sequence Repeats) *primers* amplification after *Allium cepa* exposition to the active principles, including alteration in loss, gain and band intensity change. The loss and gain of bands happened as the active principles concentration raised. The cluster method and the dissimilarity distances showed relation of dose dependence, because it separated the higher concentrations of negative control for the active principles on ISSR and SSR, with exception of the principles procimidone and iprodione on SSR. These data indicate relation among the used analyses, and are reliable indicators to detect alterations by chemical substances. The molecular markers ISSR and SSR are efficient tools on evaluating alterations caused on DNA by fungicides and may be used in toxicity studies.

Key words: mutagenicity, SSR, ISSR, cytogenetic.

1. INTRODUÇÃO

A agricultura busca o aumento da produtividade e a maximização dos lucros, assim utiliza-se elevada quantidade de agrotóxicos, aos quais destacam os herbicidas, inseticidas e fungicidas, que podem ocasionar contaminação e desequilíbrio do meio ambiente (GRÜTZMACHER, et al., 2008). Dentre estes, podemos destacar o uso de fungicidas, que são utilizados para controle de diversas doenças, visando o aumento da produtividade das lavouras. Os fungicidas por serem usados em larga escala promovem contaminação das águas e solos, afetando a fauna e flora do ambiente (BATTAGLIN et al., 2011; SILVA et al., 2009).

O Brasil é o país que mais utiliza agrotóxicos no mundo, devido ao cultivo de monoculturas (ANVISA, 2012). Esses compostos têm a capacidade de se acumular nos organismos e no ecossistema, sendo potencialmente mutagênicos, carcinogênicos ou teratogênicos. Assim, é importante conhecer e elucidar os danos ocasionados pelos agrotóxicos, pois todos os seres vivos estão sujeitos aos efeitos que são causados pelos agroquímicos e seus componentes (LEME; MARIN-MORALES, 2009).

Para elucidar os efeitos causados por substâncias tóxicas, são utilizados vegetais superiores, por apresentarem uma alta sensibilidade a agentes mutagênicos em diversos ambientes, possibilitarem a análise simultânea de vários mecanismos de ação e a detecção desde mutações pontuais até aberrações cromossômicas em células de diferentes órgãos e tecidos, como polén, raiz e folhas (GRANT, 1994; LEME; MARIN MORALES, 2009). Dentre os organismos bioindicadores, destaca-se a *Vicia faba*, *Tradescantia paludosa* e *Allium cepa* que são usados no monitoramento e na detecção de locais contaminados (ATEEQ et al., 2002).

O *Allium cepa* é amplamente utilizado em trabalhos de prospecção de efeitos tóxicos de poluentes ambientais, sendo descrita uma relação de 82 % de sensibilidade, quando comparado aos modelos animais, como roedores, em estudos de carcinogenicidade. Assim, os resultados de mutagenicidade e genotoxicidade em estudos com *Allium cepa* podem ser comparados aos obtidos com mamíferos (LEME; MARIN-MORALES, 2007; PÉREZ et al., 2011; ARRAES et al., 2012).

Os testes macroscópicos são usados para verificar o potencial fitotóxico de substâncias tóxicas, por meio do processo de germinação e crescimento radicular nas fases iniciais de desenvolvimento das sementes, pois a raiz é o primeiro órgão do vegetal ao entrar em contato com as substâncias (GOPALAN, 1999; VALERIO et al.,

2007). Esses testes permitem avaliar a toxicidade tanto de resíduos inorgânicos (ANDRADE et al., 2010) quanto orgânicos (YOUNG et al., 2012) e sua aplicação, quando feita conjuntamente com testes citogenéticos, possibilita ampla exploração dos dados obtidos (ANDRADE et al., 2010).

Os testes microscópicos permitem obter informações da estrutura organizacional dos cromossomos e do comportamento em diferentes fases de divisão celular, por meio da análise do ciclo celular (GRANT, 1994), permitindo verificar anormalidades no índice de divisão celular e presença de aberrações cromossômicas ou nucleares (KUMARI et al., 2011; ANDRADE et al., 2010).

Com o avanço da biologia molecular, é possível verificar alterações diretas no DNA por meio de marcadores moleculares baseados em PCR (*Polimerase Chain Reaction*). Os marcadores são considerados ferramentas complementares à análise citogenética, pois permitem observar alterações no padrão de eletroforese de fragmentos amplificados por PCR, por alterações causadas no sítio de ligação do *primer*. Além disso, são úteis em estudos de genotoxicidade por apresentarem alta sensibilidade, resposta em período curto de tempo e necessita de pouca quantidade de DNA (MONTEIRO et al., 2007; QARI, 2009).

Entretanto, a utilização de marcadores é pouco estudada no contexto de toxicidade, embora apresente perspectivas para avaliação do efeito tóxico sobre os organismos e populações que habitam ambientes contaminados (ATIENZAR; JHA, 2006). Apesar da pouca utilização, estudos mostraram que possui concordância entre análises citogenéticas e moleculares, sugerindo que podem ser usadas de forma complementar (QARI, 2010).

Os marcadores que são usados para análise de toxicidade destacam o SSR (*Sequência Simples Repetitiva*) e o ISSR (*Inter Sequência Simples Repetitiva*), por serem marcadores robustos e informativos. Os SSRs são codominantes, altamente polimórficos, multialélicos e de boa reprodutibilidade e altamente informativos (BUSO, 2003). Os ISSRs são de alto polimorfismo, amplificam regiões entre SSR e podem se tornar uma metodologia universal para identificar genes alvos específicos para agentes genotóxicos, considerados eficientes na avaliação da atividade genotóxica de metais pesados (AL-QURAINY, 2010).

Assim, devido à importância de entender os efeitos e os danos ocasionados pelos fungicidas nos organismos vivos, existem diversos testes que são utilizados para verificar a mutagenicidade e citogenotoxicidade desses compostos.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. TOXICIDADE E MÉTODOS DE DETECÇÃO

A ciência que estuda os efeitos causados pelos compostos tóxicos em organismos vivos é denominada de toxicologia, que avalia a ocorrência, natureza, incidência, mecanismo e os fatores de risco que substâncias químicas podem causar nos organismos vivos (ZAKRZEWSKI, 1994; JAMES et al, 2000; HODGSON, 2004). A toxicidade é uma particularidade que demonstra o potencial de uma substância em proporcionar efeito danoso em um organismo vivo, dependendo da concentração, das propriedades do composto químico e do tempo ao qual o organismo é exposto (RAND, 2000).

Os testes de toxicidade são realizados em laboratórios e conduzidos em condições específicas e controladas, usados para avaliar a toxicidade de substâncias, efluentes industriais e amostras ambientais (águas ou sedimentos). Nesses ensaios, os organismos-testes utilizados são expostos a diversas concentrações da amostra e os efeitos tóxicos produzidos sobre eles são observados e quantificados. Esses testes têm o objetivo de avaliar o efeito de agentes físicos, químicos e biológicos a diferentes organismos, analisando o potencial de risco à saúde humana e a vida aquática, permitindo melhor controle e monitoramento da qualidade dos ecossistemas (DORNFELD, 1997; RIBO, 2002; ARRAES; LONGHIN, 2012).

Os testes seguem algumas normas e padronizações que são seguidas para que sejam consideradas eficientes. As normas a serem seguidas são de diluição, controle negativo e positivo. As que envolvem as diluições são usadas para mensurar a concentração da substância a ser testada e verificar se esta apresenta efeito ou não sobre o material. Esse procedimento proporciona informações sobre a relação de concentração/ efeito, permitindo estimar a proximidade dos limites de toxicidade. O controle negativo usa a mesma população dos testes, mas não adiciona a substância que vai ser testada, permitindo verificar até que ponto os efeitos podem ter sido ocasionado por outro fator. No controle positivo, usa-se uma substância tóxica que possui efeito conhecido para confirmar que o organismo responde de forma adequada (MAGALHÃES; FERRÃO- FILHO, 2008).

Os métodos de avaliação utilizam plantas superiores e são considerados excelentes modelos genéticos por apresentarem alta sensibilidade a agentes tóxicos em diferentes ambientes, possibilitar a análise simultânea de vários mecanismos de ação, detectar mutações pontuais e aberrações cromossômicas (GRANT, 1994; LEME; MARIN-MORALES, 2009). Dentre as espécies de vegetais usadas como modelos, *Allium cepa* é usada na avaliação de agentes citotóxico, genotóxico e mutagênico (GRANT, 1982; FISKESJÖ, 1985; MATSUMOTO et al., 2006; LEME; MARIN-MORALES, 2009).

Os testes com *Allium cepa* destacam-se por essa espécie possuir elevada sensibilidade e boa correlação com outros sistemas-testes, sobretudo com os de mamíferos. Também são utilizadas para averiguar danos ao DNA, no ciclo mitótico e alterações cromossômicas (ARRAES; LONGHIN, 2012; TEDESCO; LAUGHINGHOUSE, 2012). Além disso, apresentam crescimento rápido das raízes, grande número de células em divisão, fácil manuseio, baixo custo, são tolerantes a diversas condições de cultivo, número reduzido de cromossomos e de grande tamanho ($2n=16$) (QUINZANI-JORDÃO, 1978; FISKEJO, 1985; RANK; NIELSEN, 1998; PATRA; SHARMA, 2002; MATSUMOTO; MARIN-MORALES, 2004; FERNANDES et al., 2007; LEME; MARIN-MORALES, 2009).

A utilização de *Allium cepa* em testes de toxicidade fornecem informações macro e microscópicas. Quando relacionada ao macroscópico, permite verificar a formação de tumores nas raízes e avaliar o crescimento radicular. No microscópico, possibilita analisar a taxa de divisão celular por meio do índice mitótico, aberrações cromossômicas que acontecem nas fases de metáfase e anáfase e a formação de micronúcleos (MONARCA et al., 2000).

Para averiguar os efeitos ocasionados por compostos tóxicos, são usados testes de toxicidade, fitotoxicidade e citotoxicidade. Os dois primeiros relacionados à germinação de sementes e ao crescimento radicular de sementes colocadas em contato com compostos tóxicos (BENASSI, 2004). A germinação é uma sequência de eventos fisiológicos influenciados especialmente pela água, pois sua absorção, respiração e atividade metabólica das sementes aumentam. Assim, a água tóxica ou contaminada compromete à germinação. Dessa forma, algumas espécies podem ser usadas como indicadores de toxicidade para substâncias tóxicas, podendo verificar a inibição da germinação e do crescimento da radícula da raiz (GARCIA, 2006).

Os bioensaios de germinação e crescimento radiculares são simples, rápidos, confiáveis e baratos (VALERIO et al., 2007), além de efetivos na avaliação de toxicidade de resíduos inorgânicos e orgânicos. Quando realizados juntamente a testes citogenéticos permitem ampla exploração dos dados obtidos (ANDRADE et al., 2010; YOUNG et al., 2012).

Os testes de citotoxicidade são utilizados para verificar se uma substância pode ocasionar morte celular, provocando danos às funções celulares básicas. Esses testes *in vitro* são desenvolvidos para estimar de forma mais rápida o potencial tóxico de diversas substâncias ou compostos (EISENBRAND, 2002).

Outra área usada para verificar danos ocasionados por agrotóxicos é a citogenética, possibilitando a análise dos cromossomos, sendo possível visualizar o tamanho, formas, número e comportamento, durante a mitose e a meiose por meio do microscópico (THIRIOT-QUIÉVREUX, 2002). Nessa análise, são averiguadas alterações no ciclo celular devido às detecções de anormalidades no índice de divisão celular ou à presença de aberrações cromossômicas ou nucleares (ANDRADE et al., 2010; KLACKNICK, 2011; KUMARI et al., 2011).

Testes de aberrações cromossômicas são utilizados para estimar o efeito genotóxico e também os mecanismos de ação clastogênico e aneugênico (LEME et al., 2008). Os clastogênicos promovem quebras dos cromossomos e os aneugênicos causam aneuploidia ou segregação cromossômica anormal (ANDRADE, 2007). As aberrações são ocasionadas principalmente pela quebra das fitas de DNA, ocorrendo de forma espontânea pelos processos celulares, podendo ser induzidas por agentes físicos ou químicos (OBE et al., 1992; BRYANT, 1998; PFEIFFER et al., 2000). Quebras podem ocasionar alterações estruturais cromossômicas, como perda de um segmento cromossômico, duplicações, inversões (que envolvem duas quebras cromossômicas e a reinserção do fragmento no mesmo cromossomo invertido) e troca de partes entre cromossomos não homólogos (SUMNER, 2003).

As alterações no fuso mitótico também podem promover alterações no número de cromossomos, por afetar a segregação na divisão celular. Essas alterações numéricas podem ser de dois tipos: euploidias que são mudanças no conjunto cromossômico total e a aneuploidia que ocorrem por causa de mudanças em parte do conjunto cromossômico, devido à segregação anormal dos cromossomos que acontece naturalmente e/ou pela ação de agentes aneugênicos (ALBERTINI et al., 2000). Algumas dessas aberrações são

irreversíveis e são danosas as células ocasionando processo de morte celular (ANDRADE-VIEIRA et al., 2012).

2.2. AGROTÓXICOS

Com a crescente ação antrópica ocorrem emissões de poluentes no ambiente, dentre os quais se destacam os agrotóxicos. Essas substâncias vêm ocasionando impactos no ecossistema, pois são lixiviados e afetam lençóis freáticos, águas superficiais, organismos-alvo e podem causar danos a diversos organismos não alvos como insetos que são considerados inimigos naturais, organismos aquáticos e terrestres e podem ocasionar danos à saúde humana (BRASIL, 2002; CARSON, 2010). Dessa forma, surge a importância de se conhecer a toxicidade dos agrotóxicos que são usados em grande quantidade nas lavouras brasileiras, pois esses compostos promovem danos ao DNA, podendo desencadear efeitos carcinogênicos e anormalidade morfológicas, afetando a sobrevivência das populações (BOLOGNESI, 2003).

Agrotóxicos são quaisquer substâncias, ou mistura das mesmas, usadas para evitar, eliminar ou reduzir qualquer praga. Assim, inclui os vetores de doenças humanas e animais, espécies indesejadas de plantas e animais, que promovem danos durante a produção, processamento, estocagem, transporte ou distribuição de alimentos, produtos agrícolas, madeira e derivados (PERES; MOREIRA, 2003).

Agrotóxicos, pesticidas, agroquímicos, defensivos agrícolas são algumas denominações relacionadas aos compostos que são constituídos por uma grande diversidade de substâncias químicas ou produtos biológicos fabricados de forma a aumentar a ação biocida (VEIGA, 2007).

Existem diferentes formulações de pesticidas, estes podem ser agrupados em fungicidas, herbicidas, inseticidas, microbiocida, acaricida e nematocida, de acordo com o organismo alvo, e são classificados quanto à finalidade, ao modo de ação, à origem e à toxicidade (KRÜGER, 2009). Essas formulações são compostas por princípios ativos, esse termo é utilizado para descrever as substâncias responsáveis pela atividade biológica. Um mesmo princípio ativo pode ser comercializado sob diversas formulações e diferentes nomes comerciais, além de serem encontrados produtos com mais de um princípio ativo (BRAIBANTE; ZAPPE, 2012).

Os fungicidas constituem um dos principais defensivos utilizados na agricultura, e são utilizados para controle das doenças fúngicas. São usados desde a antiguidade,

mas tiveram reconhecimento quando Alexis Millardet desenvolveu a calda bordalesa em 1882 para o controle do míldio-da-videira (ZAMBOLIM; JESUS, 2008). Podem ser classificados em fungicidas sistêmicos e de contato e com relação ao grupo químico em triazol, ditiocarbamatos, benzimidazol e dicarboximidas.

Em estudo realizado pela ANVISA, os grupos químicos triazol e dicarboximida e os princípios ativos desses grupos foram encontrados em amostras alimentares em elevadas quantidades. No Programa de análise de resíduos de agrotóxicos em alimentos (PARA), realizado no ano de 2011, analisaram 1.628 amostras de alimentos, destas 64 % foram satisfatórias em relação à presença de resíduos de agrotóxicos, sendo que em 22 % dessas amostras não se verificou a presença de resíduo e em 42 % foram encontrados resíduos, mas estavam dentro do limite que é permitido. E 36 % foram consideradas insatisfatórias, apresentando resíduos acima do limite permitido ou não autorizado para a cultura a qual foi analisada (Figura 1) (PARA, 2011, 2012).

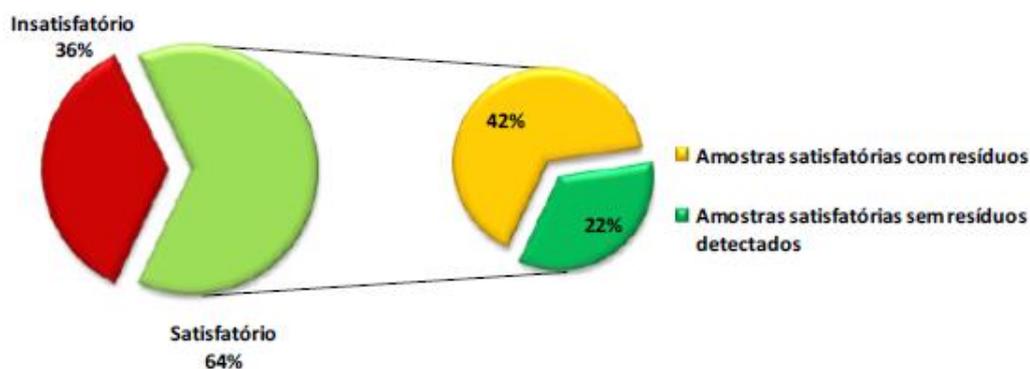


Figura 1. Classificação das amostras estudadas pela ANVISA segundo a presença ou ausência de resíduos de agrotóxicos nos alimentos avaliados. (Fonte: PARA, 2011)

Os triazóis e dicarboximidas apresentaram em elevadas quantidades nas amostras analisadas e foram classificados como insatisfatórios, devido à presença de resíduos acima do limite permitido nas amostras alimentares no ano de 2011 e 2012 (Figura 2 e 3) (PARA, 2011, 2012).

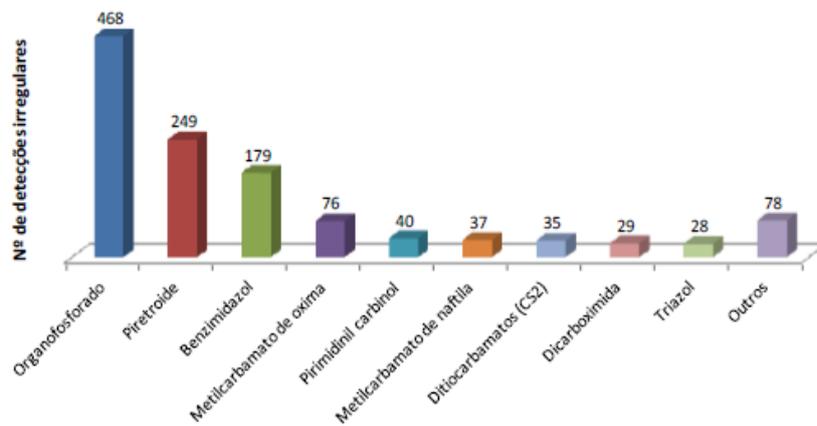


Figura 2. Grupos químicos que apresentaram elevadas quantidades de resíduos nas amostras insatisfatórias no ano de 2011. (Fonte PARA 2011, 2012)

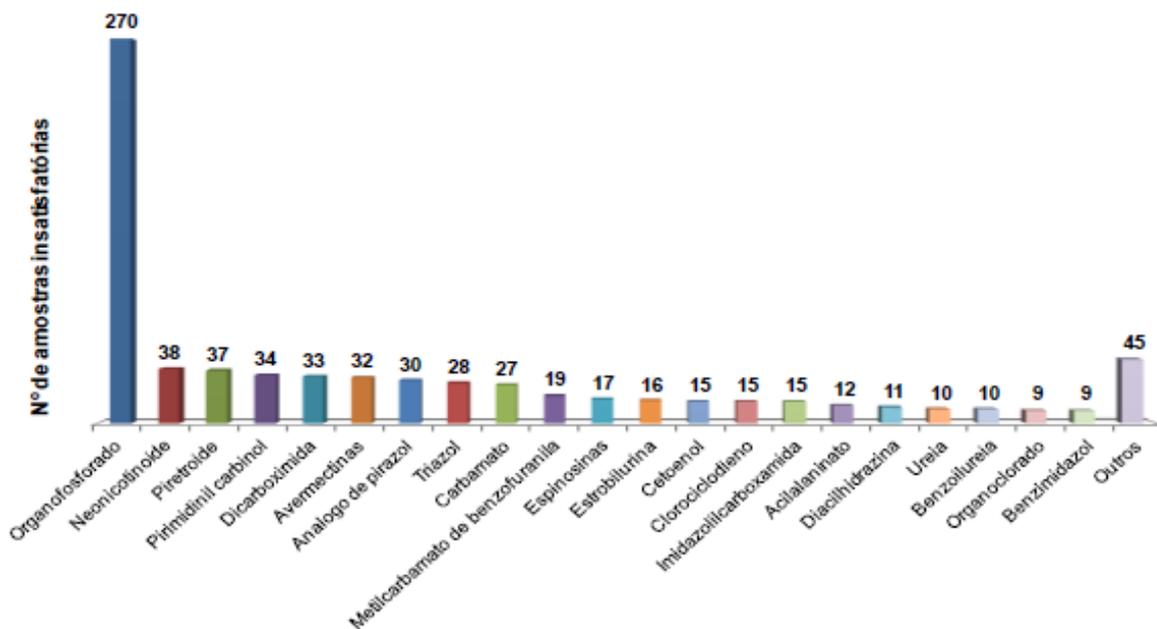


Figura 3. Grupos químicos que apresentaram elevadas quantidades de resíduos nas amostras insatisfatórias no ano de 2012. (Fonte PARA 2011, 2012)

2.2.1. Grupo químico Dicarboximida

Os dicarboximidias são um grupo constituído por um ou mais halogênios em suas moléculas e pertencem ao grupo químico dos organohalogenados (SOARES, 2011). Possuem dois modos de ação que os classificam como de contato e sistêmico. São utilizados para impedir a germinação de esporos, ocasionando ramificação, intumescimento e lise de hifas. Os dicarboximidias agem sobre a respiração bloqueando

a atividade da enzima NADH citocromo-c-redutase, promovendo a peroxidação dos lipídeos (EHR; KEMMITT, 2002).

Os fungicidas desse grupo possuem toxicidade baixa, apresentando baixo risco de intoxicações para as diversas formas de exposição humana. Nesse grupo, estão alguns princípios ativos de importância em análises de toxicidade, princípios como iprodiona e procimidona, ingredientes ativos encontrados na análise de resíduos de agrotóxicos em alimentos realizados pela ANVISA no Relatório de Análise de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos (PARA) em 2010.

O ingrediente ativo iprodiona apresenta toxicidade aguda e apresenta duas classificações toxicológicas de acordo com estudos realizados com animais. Quando absorvido pelos olhos, via cutânea e oral, é classificado na categoria III e na inalação aguda e com um sensibilizador dérmico é classificado na categoria IV, praticamente não tóxico (ANVISA, 2007).

O procimidona é um fungicida sistêmico, empregado em diferentes culturas de frutíferas e de hortaliças, que inibe o crescimento de micelas. A classificação toxicológica é IV, mas quando comercializado com produto comercial a sua classe toxicológica é II, altamente tóxica. No Brasil, é comercializado com o nome de Sialex 500 entre outros (ANVISA, 2003).

Em estudos realizados com animais, verificou-se redução da ação do princípio, a sua absorção pelo trato gastrointestinal e a excreção é rápida, sendo eliminado principalmente pela urina (89,8%), mas também pelas fezes (10,3%) (BRASIL, 2002). Também pode promover mudança na diferenciação sexual de ratos machos imaturos *in vitro*, atuando como um antagonista do receptor de androgênio e induzindo a atividade estrogênica.

2.2.2. Grupo químico Triazol

Os triazóis são fungicidas de ação sistêmica, formado por compostos heterocíclicos constituídos por três átomos de nitrogênio no mesmo núcleo cíclico. São sintéticos, possuem atividade biológica e se dividem em três sais: 1,2,3-triazol monocíclico, benzotriazóis e 1,2,3-triazol (FREITAS et al, 2011).

Nesse grupo, estão os princípios ativos tebuconazol e difenoconazol, que foram encontrados pela ANVISA na análise de resíduos de agrotóxicos em alimentos em 2010 no Relatório de Análise de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos.

O tebuconazol inibi a síntese de ergosterol (TEBUCO, 2010), o principal composto da membrana plasmática dos fungos (SILVERIRA, 2012). Portanto, o ergosterol é importante para manter a permeabilidade e a fluidez da membrana (SHEEHAN et al. 1999), com a falta deste ocasiona a perda dos componentes citoplasmáticos promovendo a morte das células (SILVEIRA, 2012).

O princípio tebuconazol apresenta classificação toxicológica IV, pouco tóxico. Legalmente comercializado no Brasil, sendo usado em diversas formulações, em 37 produtos utilizados em diferentes culturas (AGROFIT, 2013). Entretanto, quando comercializado como um concentrado emulsionável possui a classificação toxicológica I, sendo extremamente tóxico, podendo ocasionar danos à saúde humana, irritações cutâneas, oculares e respiratórias, e tóxico a muitos microrganismos aquáticos (ANVISA, 2010).

Em estudos realizados com ratos, o tebuconazol promoveu alterações na função reprodutiva, no desenvolvimento neuronal, na síntese de hormônios e ocasionou a feminilização dos machos expostos durante a gestação e lactação. Em humanos, não se conhecem os efeitos de toxicidade (TAXVIG et al, 2007; MOSER et al, 2001).

Outro princípio ativo desse grupo é o difenoconazol, que promove o rompimento da parede celular, controlando o crescimento de diversas classes de fungos. Em estudos com ratos que utilizaram difenoconazol radiomarcado, foi observada recuperação deste material acima de 98% em 96 horas. A degradação do composto inclui algumas etapas como a hidrólise, a redução e hidroxilação do anel fenil, que irá produzir um triazol livre e o ácido carboxílico que é derivado do éter difenílico (SYNGENTA, 2013).

2.3. MARCADORES MOLECULARES EM TOXICOLOGIA

O recente avanço na biologia molecular proporcionou novos métodos de detecção de genotoxicidade. Dentre as técnicas, a *Reação em Cadeia da Polimerase* (PCR) permite avaliar os fragmentos que foram amplificados detectando o potencial dos poluentes em causar danos, mutações e distorções estruturais no DNA, por meio da mudança no padrão de eletroforese, pois as modificações estruturais afetam a ligação do *primer* ao DNA. Sendo, dessa forma, modo eficiente e inovador de se verificar as lesões geradas por agente genotóxicos e/ou mutagênicos (ATIENZAR et al., 2002; ATIENZAR; JHA, 2006; NOEL; RATH, 2006).

As alterações geradas nos perfis de eletroforese podem ser oriundas: de geração de um novo sítio de anelamento do *primer* ou a eliminação de um já existente; alteração da distância entre dois sítios de ligação do *primer*; alteração na capacidade da polimerase de amplificar ou alteração das quantidades relativas de alvos para a amplificação. (ANDRADE –VIEIRA et al., 2012).

Marcadores moleculares com diversas características permitem determinar os danos e lesões ocasionados por compostos tóxicos no ambiente (JHA, 2004). A análise de genotoxicidade baseada em marcador permite quantificar o efeito genotóxico utilizando análise de *clusters* entre DNA controle e DNA exposto a substância tóxica (LABRA et al., 2004) e revela como o agente tóxico afeta a estrutura genética das populações (WOLF et al, 2004).

Dentre os marcadores utilizados em ensaios genotóxicos, destacam-se o AFLP (Polimorfismo de Comprimentos de Fragmentos Amplificados), RAPD (Polimorfismo de DNA Amplificado ao Acaso), ISSR (Inter Sequências Simples Repetitivas) e SSR (Sequências Simples Repetitivas)

O AFLP é um marcador dominante, os seus fragmentos são obtidos pelo uso de enzimas de restrição. Geram um grande número de polimorfismos, sendo eficiente na amostragem do genoma sem a necessidade de conhecer a sequência prévia de DNA (FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1998; FALEIRO, 2007). Com esse marcador, é provável mostrar o aparecimento de mutações e quantificar o efeito genotóxico utilizando análise de *clusters* entre DNA controle e o exposto a agentes tóxicos e também mensurar a variabilidade genética nas populações expostas à contaminação (BAGLEY et al., 2001; LABRA et al., 2004). Aina et al. (2006) detectaram alterações nos fragmentos de DNA, por meio de AFPL quando expostos a benzo pireno [a] naftaleno.

O RAPD é um marcador dominante e sua técnica consiste na utilização de primers arbitrários curtos. Possui baixo custo, de fácil execução e a obtenção dos resultados é de forma rápida (CAIXETA et al., 2006). Devido a sua natureza aleatória, é amplamente difundido para ensaios de genotoxicidade e mutagenicidade (ATIENZAR; JHA, 2006).

O marcador RAPD é usado para averiguar danos causados ao DNA e eventos mutacionais, como ponto de mutação e inserção ou deleções pequenas (ATIENZAR et al., 2000). Em estudos realizados, verificou-se que esse marcador apresentou boa resposta em detectar alterações no DNA de bactérias, animais e plantas, quando foram

colocadas em contato com pequenas doses do poluente, principalmente no sistema aquático (CONTE et al., 1998; ATIENZAR et al., 2000; MENGONI et al., 2000; THEODORAKIS, 2001; ATIENZAR et al., 2002; ATIENZAR et al., 2004; HAGGER et al., 2005). Esse marcador é extensivamente usado para avaliar a composição genética de populações em ambientes poluídos (YANG et al., 2000; WOLF et al., 2004) e para relacionar os *fingerprints* a parâmetros fisiológicos (ATIENZAR et al., 2000), de sobrevivência e desenvolvimento (HAGGER et al., 2005). A limitação desse marcador é quanto a reprodutibilidade dos resultados, por isso vários protocolos têm sido usados para otimizar condições de amplificação (BAGLEY et al., 2001; ATIENZAR et al., 2002; ATIENZAR; JHA, 2006).

O ISSR é um marcador dominante baseado em PCR e amplifica sequências genômicas entre *loci* de microssatélites (SON et al., 2012), podendo ser utilizado para qualquer espécie que contém um número e distribuição dos motivos de SSR suficientes em seu genoma (BUHULIKAR et al., 2004). Também tem mostrado ser uma poderosa ferramenta em estudos de genotoxicidade, como foi verificado por Al-Qurainy (2010), onde demonstrou que esse marcador pode ser usado para a medição quantitativa e qualitativa da atividade genotóxica causada por metais pesados.

Os microssatélites (SSR) são marcadores constituídos por sequências de DNA de 1-6 pares de base (pb) que se repetem em tandem (TÓTH et al., 2000). São abundantes no genoma, altamente polimórficos e reprodutíveis. Estudos recentes mostraram a eficiência desse marcador na avaliação do efeito mutagênico/genotóxico em plantas (MONTEIRO et al., 2007; PAIVA et al., 2006). No entanto, sua utilização em bioensaios de plantas superiores ainda é pouco explorada (MONTEIRO et al., 2007), pela necessidade de desenvolvimento de *primers* para espécie. Além disso, estudos demonstram que as mutações que ocorrem em *loci* microssatélites resultam em perda de heterozidossidade, surgimento de alelos mutantes e de alelos nulo como resultado de mutações nos sítios complementares aos *primers*. As análises de SSR podem fornecer uma ferramenta complementar na avaliação dos diferentes efeitos genotóxicos de compostos em plantas (MONTEIRO et al., 2009).

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo Geral

Avaliar o potencial tóxico dos fungicidas por análises macroscópicas, microscópicas e moleculares em *Allium cepa*.

3.2. Objetivos Específicos

- avaliar o potencial dos marcadores SSR e ISSR em detectar mutagenicidade;
- verificar a complementaridade de informações obtidas com as análises macroscópicas e microscópicas com as moleculares.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Material Vegetal

Para realizar as análises de fitotoxicidade, citotoxicidade, genotoxicidade e mutagenicidade dos diferentes fungicidas, sementes de *Allium cepa* var. Texas Early Grano (variedade híbrida de citoplasma macho-estéril) foram utilizadas como sistema-teste nos bioensaios realizados. As sementes foram adquiridas da Agristar (Top Seed), Petrópolis – Rio de Janeiro.

4.2. Fungicidas

Os fungicidas utilizados foram selecionados por serem de uso em olerícolas importantes como alface, cebola, tomate e pimentão, e por ter sido descrito que seus grupos químicos dicarboximida e triazol foram encontrados em quantidades irregulares em elevado número de amostras alimentares. A descrição dos princípios ativos de cada fungicida está na Tabela 1.

4.3. Soluções

Em todos os experimentos, foram utilizadas cinco concentrações de cada princípio ativo: uma baseada na concentração recomendada de uso do fungicida de acordo com o fabricante (C₃); duas concentrações menores na proporção de ¼ e ½ da concentração de uso recomendada (C₁ e C₂, respectivamente) e duas concentrações maiores 2x (C₄) e 4x (C₅) da concentração de uso recomendada (Tabela 2). A diluição da concentração recomendada foi baseada na cultura do tomate, por ser de importância econômica no Estado do Espírito Santo.

As soluções foram preparadas diluindo os princípios ativos em água destilada em um volume final de 250 mL. A água destilada foi usada como controle negativo (Co⁻) e a Trifluralina (0,84 ppm) como controle positivo (Co⁺). A trifluralina é um herbicida que pertence ao grupo químico Dinitroanilinas, que é usado como controle positivo, pois os seus mecanismos de ação são conhecidos.

Tabela 1. Descrição dos quatro fungicidas e de seus princípios ativos

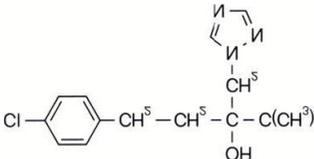
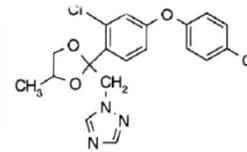
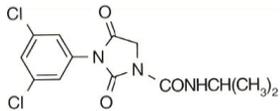
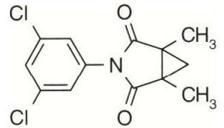
Nome comercial / Classe	Grupo químico	Princípio ativo	Nome químico	Classe toxicológica	Estrutura química	Referências
Folicur / Fungicida	Triazóis	Tebuconazol	(RS)-1-p-chlorophenyl-4,4-dimethyl-3-(1H-1,2,4-triazol-1-ylmethyl) pentan-3-ol	III - Medianamente tóxico		ANVISA, 2010
Score / Fungicida sistêmico		Difenoconazol	cis-trans-3-chloro-4-[4-methyl-2-(1H-1,2,4-triazol-1-ylmethyl)-1,3-dioxolan-2-yl]phenyl 4-chlorophenyl ether	I - Extremamente tóxico		ANVISA, 2008, 2010
Rovral / Fungicida	Dicarboximida	Iprodiona	3-(3,5-dichlorophenyl) -N-isopropyl-2,4-dioxo imidazolidine-1-carboxamide	III - Medianamente tóxico		ANVISA, 2007
Sialex / Fungicida		Procimidona	N-(3,5-dichlorophenyl)-1,2-dimethylcyclopropane-1,2-dicarboximide	II - Altamente tóxico		ANVISA, 2003

Tabela 2. Concentração ($\mu\text{g/mL}$) dos princípios ativos dos fungicidas utilizados

Concentração ($\mu\text{g/mL}$)	Princípio ativo			
	Difenoconazol (Score)	Tebuconazol (Folicur)	Procimidona (Sialex)	Iprodiona (Rovral)
C ₁	7,81	12,5	31,25	46,88
C ₂	15,63	25	62,50	93,75
C₃	31,25	50	125	187,5
C ₄	62,50	100	250	375
C ₅	125	200	500	750

4.4. Análise Macroscópica

O efeito fitotóxico dos diferentes fungicidas foi avaliado pela análise de parâmetros macroscópicos baseados na germinação das sementes e crescimento radicular das plântulas oriundas das sementes germinadas.

O experimento foi montado em DIC (Delineamento Inteiramente Casualizado) com cinco concentrações de cada um dos 4 princípios ativos, repetidas cinco vezes. Cada repetição consistiu de uma placa de Petri com trinta sementes colocadas sobre papel de germinação contendo 15 mL de solução-teste ou dos controles. As placas foram cobertas com papel alumínio para evitar influência da luz (NARWAL et al., 2008) e mantidas em BOD a 24 °C. No total, foram avaliadas 110 placas de Petri (25 de cada fungicidas mais 5 de cada controle). Durante o período de 96 h de exposição, foram realizadas contagens de germinação de 12 em 12 horas. Os parâmetros avaliados foram: porcentagem de sementes germinadas após 96 h, índice de velocidade de germinação (IVG) a cada 12 h de avaliação e o comprimento da raiz de cada semente após as 96 h de exposição, calculados pelas seguintes fórmulas:

$PSG = (\text{total de sementes germinadas} / \text{total de sementes do tratamento} \times 100).$

$IVG = [(N_1 \times 1) + (N_2 - N_1) \times 1/2 + (N_3 - N_2) \times 1/3 + \dots + (N_y - N_{y-1}) \times 1/y]$, em que N_y representa o número de sementes germinadas em um dado período e y representa o número total de períodos de avaliação.

As análises estatísticas foram feitas utilizando o programa Genes (Cruz, 2013), realizando a ANOVA e o teste de Dunnet ($p > 0.05$).

4.5. Análise Microscópica

Para averiguar o potencial citotóxico e genotóxico dos agrotóxicos, foi analisada a parte meristemática das raízes oriundas das sementes tratadas. Para isso, foram coletadas cerca de 15 raízes por placa após as 96 h de exposição, fixadas em uma solução de álcool etílico e ácido acético (3:1) e posteriormente armazenadas a $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Após a fixação, as raízes foram lavadas e hidrolisadas em HCl 5N por 18 minutos em temperatura ambiente e coradas comorceína acética 2%. Para o preparo das lâminas, os meristemas foram dissociados, cobertos com lamínula e esmagados em ácido-acético 45%. Foram preparadas duas lâminas por placa, totalizando 10 lâminas por tratamento. Em cada lâmina, foram contabilizadas aproximadamente 1.000 células, totalizando 10.000 células por tratamento.

Os efeitos citotóxicos e genotóxicos e a ocorrência de aberrações cromossômicas e aneuploidias foram analisadas em células em divisão. O índice mitótico (IM) foi obtido dividindo o número de células em divisão (prófase, metáfase, anáfase e telófase) pelo total de células avaliadas em cada tratamento. As frequências das alterações cromossômicas e nucleares foram obtidas dividindo o número de alteração (cromossômica e nuclear, respectivamente) pelo número total de células avaliadas. As análises estatísticas das variáveis foram feitas utilizando o programa Genes (Cruz, 2013), realizando a ANOVA e em seguida realizou-se o teste de Dunnet ($p>0.05$).

4.6. Análises Moleculares

As análises moleculares para avaliar a genotoxicidade e mutagenicidade dos princípios ativos foram feitas utilizando os marcadores SSR e ISSR.

Para essas análises, foi montado um experimento em DIC para os princípios ativos, com 5 concentrações de cada (Tabela 2) e 5 repetições, totalizando 100 placas, além do controle negativo em água destilada e controle positivo com trifuralina (0,84ppm). Cada placa continha sementes de *Allium cepa* que foram colocadas sobre papel de germinação com água destilada e colocadas para germinar em BOD a $24\text{ }^{\circ}\text{C}$ até atingirem cerca de 1 cm de comprimento. Após esse período, foram transferidas 25 sementes para novas placas de Petri contendo 15 mL de solução de cada fungicida, cobertas com papel alumínio e mantidas por 48 h em BOD a $24\text{ }^{\circ}\text{C}$. Posteriormente,

foram excisados segmentos de cerca de 1 cm nas extremidades de todas as raízes para a extração de DNA.

A extração foi realizada utilizando o protocolo de Doyle e Doyle (1990) com as seguintes modificações: incubação das amostras com CTAB em banho-maria a 65 °C por 45 min e agitação a cada 10 min; adição de 600 µL de clorofórmio isoamílico; adição de 400 µL de isopropanol gelado; centrifugação 12000 por 20 min.; o sobrenadante foi lavado com álcool 70% por duas vezes e foi ressuscitado em 100 µL de TE contendo 50µg/ mL de RNase. A integridade do DNA genômico foi verificada em gel de agarose 0.8% corado com brometo de etídeo e a quantidade e qualidade determinada por espectrofotometria. Para cada concentração de fungicida, foram utilizados de três a quatro DNAs com a razão A260/A280 próxima de 1,8, totalizando 78 DNAs analisados, dos quais quatro do controle positivo; quatro do controle negativo; três, para cada concentração, dos princípios ativos difenoconazol e procimidona e; quatro, para cada concentração, do tebuconazol e iprodiona.

Para as amplificações com os *primers* ISSR, foram utilizados os primers da UBC: 808, 809, 810, 812, 818, 824, 836, 884 e 886 (Tabela 3). As reações de PCR foram realizadas utilizando PCR Master Mix (Thermo Scientific), cada reação foi realizada num volume de 20.0 µL, contendo 30ng de DNA, 0.5 µM de primer e 1u de Taq DNA polimerase. As condições de amplificação foram: desnaturação inicial por 5 minutos a 94 °C; 35 ciclos de 94 °C – 1min, 50 °C – 1 min e 72 °C – 1min e; extensão final a 72 °C por 10 minutos. Os produtos de PCR foram visualizados em géis de agarose 1,5% e corados com brometo de etídeo (1 % - 10 mL), visualizados e fotografados sob luz UV. Os fragmentos foram comparados com DNA ladder100 pb (Thermo Scientific).

Dez primers SSR, descritos por Jakše et al. (2005) e Martin et al. (2005) (Tabela 3), foram utilizados nas amplificações. Esses primers foram oriundos de ESTs, portanto de seqüências expressas no genoma. Cada reação foi realizada em um volume final de 13,0 µL, usando tampão tipo IB (Pht), contendo 30 ng de DNA genômico e 0,4 µM de cada iniciador, 1,0 u de Taq DNA polimerase, 1.8 mM de MgCl₂ e 1.0 mM de dNTPs. As condições de amplificação utilizadas foram as determinadas por Jakše et al. (2005): desnaturação inicial por 4 minutos a 95 °C, seguida de 30 ciclos de 94 °C – 30 s; 58 °C – 45 s; 72 °C – 1:20 minutos e extensão final a 72 °C por 8 minutos. Os produtos de PCR foram visualizados em géis de agarose 1.5% e corados com brometo de etídeo, visualizados e fotografados sob luz UV. Os fragmentos foram comparados com DNA

ladder100 pb (Thermo Scientific). Tanto para ISSR como para SSR, as análises foram repetidas duas vezes.

Para analisar os efeitos observados com o uso dos SSR, foi feita a seguinte codificação: 11 e 22, *locus* homozigotos; 12 e 13, *locus* heterozigotos; 33, ausência de bandas; 44, arraste. Para os dados de ISSR, foi codificado 1 para presença e 0 para ausência de bandas.

Com os dados moleculares codificados, foram obtidas as distâncias entre as concentrações dos diferentes fungicidas, e por meio do quadrado da distância euclidiana para os dados de SSR e índice de dissimilaridade de coincidência simples para o ISSR. Posteriormente, foi realizado o agrupamento UPGMA (*Ligação Média Entre Grupo*). As análises foram feitas no Programa Genes (Cruz, 2013).

Tabela 3. Sequência dos primers oriundos de ESTs e natureza das repetições das Sequências Simples Repetitivas (SSR) e Inter Sequência Simples Repetitivas (ISSR)

Marcador	Tamanho fragmento descrito	Sequência dos primers	Tipo de repetição
SSR			
ACM004	203, 206, 213	F: TCGTTCTTTAGAACACGTTAGGAA R: TGTCGGCGGATATAGTGACA	(CAA)4
ACM006	220, 223, 226, 232,	F: GCAGTTCTCCCTTTGTAAAATCA R: GTGATGGATGAGTGGATGGA	(CTC)7
ACM024	120, 123, 126, 131, 134, 137, 140	F: CCCATTTTCTTCATTTTCTCA R: TGCTGTTGCTGTTGTTGTTG	(GCA)10-NNN-(GCA)4(ACA)4
ACM071	162, 166, 167, 170	F: TCTCATTTCAACTTTCTACCTATCC R: CTGACATTTGCTCGACTGGA	(AG)10
ACM082	200, 203, 206, 209	F: CACCGTTCCTCAGCTCACTT R: AGAGGGACGAAATGAAAGCA	(TCT)13
ACM091	177, 183	F: TCTCCTCCTCTAACCAGCCA R: GGTGCTCCAGTTGAGCTTTC	(TCT)10
ACM102	151, 154, 160	F: TGGATTTGTGAACAACCGAA R: GATGCAGGCAGTGTTTTGAA	(CAA)7
ACM119	252, 255, 261, 265	F: TTTCAGCAACATAGTATTGCGTC R: TCTTCGGGATTGGTATGGAG	(AAT)8
ACM124	220, 228, 245	F: GCAAAC TTGAATCCCTTCCA R: AACCCGTTAAGAGGAGGGAA	(AAAG)5
ACM133	191, 193, 196, 198	F: CCACATGGATGAAAAACACAA R: CGCTGGTAGCTGAAGCAAAT	(CA)8(CG)6
ISSR			
UBC 808	-----	AG AG AG AG AG AG AG AGC	-----
UBC 809	-----	AG AG AG AG AG AG AG AGG	-----
UBC 810	-----	AG AG AG AG AG AG AG AGT	-----
UBC 812	-----	AG AG AG AG AG AG AG AGA	-----
UBC 818	-----	CA CA CA CA CA CA CA CAG	-----
UBC 824	-----	TC TC TC TC TC TC TC TCG	-----
UBC 836	-----	AG AG AG AG AG AG AG AGYA	-----
UBC 884	-----	HBHAGAGAGAGAGAGAG	-----
UBC 886	-----	VDVCTCTCTCTCTCTCT	-----

N: A, G, C, T; Y: C, T; H: A, T, C; B: T, C, G; V: A, C, G; D: A, T, G.

5. RESULTADOS

5.1. Macroscópicos e Microscópicos

Para todos os princípios ativos avaliados, foram observadas alterações macroscópicas nas raízes de *Allium cepa* tratadas dependentes da concentração utilizada (Tabela 4).

O tebuconazol foi o que mais afetou a germinação, o IVG e o crescimento radicular. Na menor concentração, somente 50% das sementes germinaram e na maior apenas 1,33%, apresentando baixo IVG e crescimento das raízes próximo a zero nas três maiores concentrações. Os efeitos observados foram mais drásticos que os observados no controle positivo em qualquer das concentrações utilizadas desse princípio ativo.

O difenoconazol foi o segundo princípio ativo mais fitotóxico, ocasionando atraso na velocidade de germinação e retardo no crescimento radicular, em relação ao controle negativo em todas as concentrações, reduzindo em 37,55 % as sementes germinadas e 64,42 % o crescimento radicular na maior concentração. Desse modo, houve decréscimo em todos os parâmetros analisados da menor para a maior concentração.

Os princípios ativos, procimidona e iprodiona, não apresentaram redução na germinação quando comparados aos controles negativo e positivo. No entanto, o crescimento radicular foi reduzido nas maiores concentrações para os dois princípios ativos e houve redução do IVG a partir da terceira concentração (a indicada para uso) com o iprodiona.

Na maioria dos princípios ativos utilizados, houve correspondência de alterações entre o crescimento radicular, a porcentagem de germinação e o índice de velocidade de germinação.

Em relação às alterações microscópicas, foi observado que com o aumento da concentração do princípio ativo houve aumento nos danos das células meristemáticas das raízes avaliadas (Tabela 4). Em geral, o índice mitótico (IM) diferiu do controle negativo e do positivo para a maioria das concentrações dos princípios ativos aplicados. Para as aberrações cromossômicas (AC), quase todas as concentrações apresentaram diferenças significativas em relação aos controles. Quanto às aberrações nucleares (AN), a maioria dos tratamentos diferiram do controle negativo apresentando aumento nas maiores concentrações aplicadas.

Como o tebuconazol apresentou baixa germinação nas três maiores concentrações, não foi possível analisar os parâmetros microscópicos IM, AC e AN, pela ausência de raízes. Mesmo assim, esse foi o princípio ativo mais citotóxico em relação ao demais, devido à redução significativa do índice mitótico (92.28%) em relação aos controles, nas menores concentrações. Nessas concentrações, também houve aumento das aberrações nucleares, sendo maior na segunda concentração (C₂ - maior concentração que foi possível fazer lâminas), indicando menor taxa de divisão celular, acarretando em baixo IM devido à morte das células, e não sendo possível observar AC.

O difenoconazol causou um decréscimo significativo no IM a partir da C₂ e aumento significativo de AC e AN em todas as concentrações, em relação ao controle negativo. A porcentagem de alterações nucleares nas concentrações C₃, C₄ e C₅ foi estatisticamente igual ao controle positivo. Também apresentou maior média dessas aberrações em relação aos demais princípios, sendo aproximadamente 18 vezes maior que o controle negativo.

Tanto o procimidona quanto o iprodiona apresentaram decréscimo significativo no IM em relação ao controle negativo, e aumento de AC a partir da menor concentração, mas de forma menos severa que o controle positivo. Todas as concentrações dos dois princípios aumentaram a porcentagem de AN e foram semelhantes ao controle positivo, apresentando comportamento similar nos parâmetros avaliados.

Considerando os tipos de alterações cromossômicas observadas, todos os princípios ativos apresentaram a ocorrência de cromossomos perdidos, cromossomos quebrados, cromossomos pegajosos, c-metáfases, pontes e c-metáfase poliploides. Algumas dessas alterações estão representadas na Figura 4. Das alterações observadas, os cromossomos pegajosos foram observados em maior frequência para todos os princípios ativos (Tabela 5). O tebuconazol apresentou frequências mais baixas de alterações, o que é explicado pelo baixo IM e pela alta porcentagem de AN. O difenoconazol apresentou maior frequência de cromossomos perdidos, cromossomo quebrado, c-metáfase, ponte e de c-metáfase poliploide, demonstrando que esse princípio ativo tem mecanismos de ação mista, sendo aneugênico e clastogênico. Os princípios procimidona e iprodiona apresentaram efeito predominantemente aneugênico, com ação predominantemente no fuso, pois apresentaram alta frequência de alterações do tipo cromossomos perdidos, c-metáfases e cromossomos pegajosos.

Tabela 4. Parâmetros macroscópicos e microscópicos, avaliados em sementes de *Allium cepa* tratadas com os princípios ativos difenoconazol, tebuconazol, procimidona e iprodiona, com cinco concentrações cada, e controles negativo (água destilada) e positivo (trifluralina)

Tratamento/ Concentração	Germinação	Índice de velocidade de germinação (IVG)	Crescimento radicular	Índice Mitótico (IM %)	Aberrações Cromossômicas (AC %)	Aberrações Nucleares (AN %)	
Controle negativo (Co ⁻)	95.00 a ± 3.90	7.02 a ± 0.22	13.97 a ± 0.59	9.98 a	0.05 a	0.06 a	
Controle positivo (Co ⁺)	85.33 b ± 5.45	5.54 b ± 0.62	7.17 b ± 0.80	7.79 b	1.35 b	0.91 b	
Difenoconazol	C ₁	80.67 ab ± 5.47	5.68 b ± 0.80	9.97 ± 2.01	9.33 a	0.43	0.5
	C ₂	88.66 ab ± 7.30	5.33 b ± 0.66	8.76 b ± 2.07	8.68 b	0.68	0.4
	C ₃	80.00 ab ± 10.27	5.33 b ± 0.49	8.45 b ± 1.26	8.12 b	0.74	0.60 b
	C ₄	80.66 ab ± 14.61	4.92 b ± 0.89	6.96 b ± 1.69	7.95 b	0.77	0.72 b
	C ₅	59.33 ± 14.61	3.72 ± 0.90	4.97 b ± 1.87	6.71 b	0.91	0.78 b
Tebuconazol	C ₁	50.00 ± 7.07	3.26 ± 0.32	2.63 ± 0.56	5.53	0.6	20.94
	C ₂	32.67 ± 13.42	2.23 ± 0.99	1.17 ± 0.49	0.77	0.12 a	43.56
	C ₃	10.67 ± 5.48	0.61 ± 0.24	0.30 ± 0.17	0	0a	0 ab
	C ₄	4.00 ± 5.48	0.24 ± 0.32	0.09 ± 0.08	0	0a	0 ab
	C ₅	1.33 ± 1.83	0.07 ± 0.10	0.04 ± 0.05	0	0a	0 ab
Procimidona	C ₁	91.33 ab ± 3.80	6.74 ab ± 0.46	12.21 a ± 1.08	9.21 a	0.25 a	0.60 b
	C ₂	78.67 b ± 9.01	5.30 b ± 0.96	9.56 b ± 2.09	9.04 a	0.31	0.78 b
	C ₃	90.67 ab ± 7.23	6.49 ab ± 0.71	13.21 a ± 1.38	9.66 a	0.24 a	0.65 b
	C ₄	91.33 ab ± 12.16	6.40 ab ± 1.26	10.42 ± 2.02	8.97 ab	0.34	0.78 b
	C ₅	89.33 ab ± 8.63	6.28 ab ± 0.72	11.54 a ± 1.58	8.43 b	0.52	1.37 b
Iprodiona	C ₁	85.33 ab ± 13.04	5.74 ab ± 0.74	10.78 ab ± 1.47	8.94 a	0.25 a	0.93 b
	C ₂	86.67 ab ± 4.08	6.60 ab ± 0.66	10.80 ab ± 2.30	9.08 a	0.39	0.84 b
	C ₃	71.33 b ± 17.09	4.44 b ± 1.49	10.16 ab ± 5.56	9.29 a	0.38	0.78 b
	C ₄	78.67 ab ± 16.09	5.00 b ± 1.16	7.22 b ± 1.48	8.02 b	0.42	1.10 b
	C ₅	78.00 ab ± 8.36	5.05 b ± 0.62	7.45 b ± 1.22	8.13 b	0.56	1.08 b

As médias seguidas pela mesma letra *a* (Co⁻) nas colunas não diferem estatisticamente entre si, a 5% de probabilidade, pelo Teste Dunnet. As médias seguidas pela mesma letra *b* (Co⁺) nas colunas não diferem estatisticamente entre si, a 5% de probabilidade, pelo Teste Dunnet.

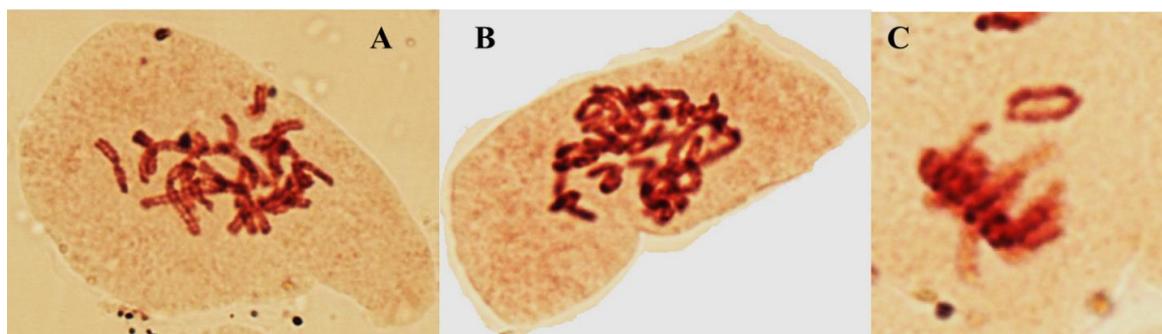


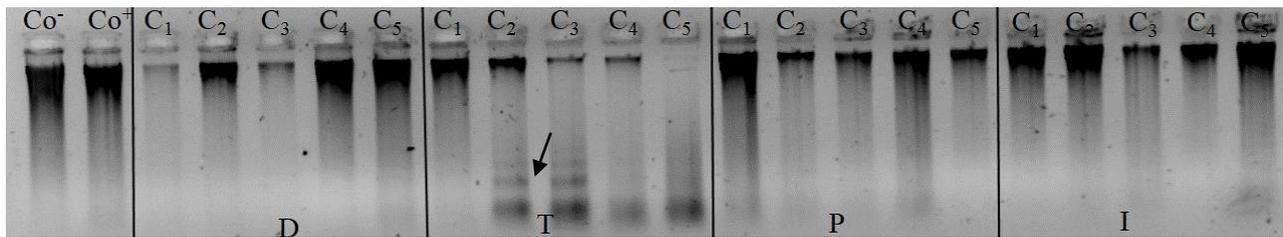
Figura 4. Alterações aneugênicas/ clastogênicas encontradas em maior frequência em células meristemáticas de *Allium cepa* quando submetidas aos tratamentos com os princípios ativos difenoconazol, tebuconazol, procimidona e iprodiona. A: c-metáfase; B: c-metáfase poliplóide; C: cromossomo perdido

Tabela 5. Análise geral das alterações observadas em relação ao total de células de *Allium cepa* analisadas para os princípios ativos e os controles, para porcentagem de cromossomo perdido; cromossomo quebrado; cromossomo pegajoso; c-metáfase; ponte e c-metáfase poliploide, respectivamente

Tratamento	C. perdido	C. quebrado	C. pegajoso	C-metáfase	Ponte	C-met. Pol.
Controle negativo	0	0	0.49	0	0	0
Controle positivo	0.39	0.19	2.65	7.33	0.58	1.27
Difenoconazol	1.48	0.49	10.39	16.11	2.07	2.27
Tebuconazol	0.47	0.10	2.40	0.59	0.48	0.00
Procimidona	0.79	0.00	7.79	3.76	1.28	0.10
Iprodiona	0.88	0.20	13.11	2.65	1.56	0.58

5.2. Marcadores Moleculares

Na análise do DNA, houve morte celular por necrose e por morte celular programada (MPC) (Figura 5). A necrose ocorreu na concentração C₅ do tebuconazol, esta é caracterizada pelo arraste. A MPC ocorreu na C₂ e C₃ do tebuconazol, e na C₅ do difenoconazol, pela observação do perfil de fragmentos de DNA caracterizada como escada.



Todos os ISSRs avaliados e seis dos dez SSR usados detectaram modificações no *fingerprint* de DNA de raízes de sementes tratadas e não tratadas. As alterações observadas para o ISSR e SSR resultaram em ganho de novas bandas, perda de bandas e redução na intensidade de bandas comparadas ao controle negativo (Tabela 6).

Para o ISSR, os princípios tebuconazol, procimidona e iprodiona apresentaram mais alterações nas maiores concentrações (C₃, C₄, C₅) e o difenoconazol apresentou na menor concentração (C₁). O tebuconazol apresentou a maior quantidade total de alterações com este marcador, sendo que das 452 bandas alteradas, 234 (51,77 %) correspondem a esse princípio ativo. Destas, 76,07 % correspondem à perda e 23,93 % ao ganho de banda.

Os princípios iprodiona e o procimidona foram os segundos que ocasionaram maiores alterações, sendo que das 96 e 76 bandas alteradas, 47,92 e 46,05 % correspondem ao ganho e 52,08 e 53,95 % à perda de bandas, respectivamente. Portanto, observa-se que esses princípios apresentaram comportamentos similares nas alterações, apresentado diferença de aparecimento e desaparecimento menor que 2%. O mesmo comportamento foi observado nas análises macroscópicas e microscópicas, isso pode ocorrer devido a esses princípios pertencerem ao mesmo grupo químico. O difenoconazol apresentou menos alterações, sendo das 46 bandas alteradas, 43,48 % correspondem ao ganho e 56,52 % à perda de bandas.

Com SSR, o tipo de alteração que mais ocorreu foi ganho de bandas. Maior quantidade de ganho de bandas ocorreu nas maiores concentrações (C₃, C₄ e C₅) para os princípios difenoconazol, procimidona e iprodiona. Para o tebuconazol, ocorreu na menor concentração (C₁). Assim, verifica-se que o princípio ativo iprodiona apresentou mais alterações, apresentando 100 % de ganho de bandas. O difenoconazol em um total de 12 bandas alteradas, 83,33 % correspondem ao ganho e 16,66 % à perda de bandas.

O tebuconazol teve 55,55 % de ganho de bandas, das nove bandas alteradas e 44,44 % correspondem à perda. O procimidona apresentou oito bandas alteradas, destas

87,5 % correspondem ao ganho e 12,5 % à perda de bandas. Para SSR, houve maior quantidade de ganho do que perdas de bandas, ao contrário do observado para ISSR. As bandas ficaram entre 150 a 500 pb.

Tabela 6. Análise geral de ganhos, perdas e intensidade de bandas em relação ao controle negativo de cada princípio ativo com marcador ISSR e SSR

ISSR (UBC)	N° G				N° P				DI			
	D	T	P	I	D	T	P	I	D	T	P	I
808	0	5	1	4	0	9	0	1	0	1	1	2
809	5	8	14	18	0	1	0	0	3	5	4	5
810	7	14	7	5	3	64	4	9	0	1	2	1
812	3	11	5	0	0	0	0	0	0	11	1	0
818	0	6	0	0	1	45	4	8	0	0	0	0
824	2	6	8	9	0	10	3	3	0	0	0	0
836	0	2	0	2	7	8	7	5	0	0	0	0
884	3	2	0	6	8	33	16	19	3	0	0	3
886	0	2	0	2	7	8	7	5	0	0	0	0
Total	20	56	35	46	26	178	41	50	6	18	8	11

SSR (ACM)	N° G				N° P				DI			
	D	T	P	I	D	T	P	I	D	T	P	I
004	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
091	3	1	1	4	2	3	1	0	0	0	0	0
102	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0
119	5	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0
124	2	2	2	7	0	0	0	0	0	0	0	0
133	0	1	4	1	0	0	0	0	0	0	0	0
Total	10	5	7	14	2	4	1	0	0	0	0	0

N° G: número de bandas ganhas; N° P: número de bandas perdidas; DI: diminuição na intensidade. D: Difenconazol; T: Tebuconazol; P: Procimidona; I: Iprodiona.

As dissimilaridades e distâncias obtidas pelos marcadores moleculares ISSR e SSR, respectivamente, indicaram a quantidade de alterações moleculares detectadas no DNA entre as concentrações de cada princípio ativo em relação aos controles (Tabela 7). Quanto maiores as dissimilaridades ou distâncias, mais alterações moleculares detectadas em relação ao controle negativo.

As dissimilaridades obtidas com os ISSR variaram de 0,048 (entre C₄ e C₅ do difenoconazol) a 0,259 (entre Co⁻ e C₅ do tebuconazol) e entre os controles foi de 0,089. As distâncias obtidas com os SSR variaram de 0,500 (entre C₄ e C₅ do difenoconazol) a 6,281 (entre Co⁺ e C₅ do tebuconazol) e entre os controles foi de 1,406. Para todas as concentrações dos princípios ativos, foram observadas diferenças nas dissimilaridades e distâncias em relação aos controles negativo e positivo, mostrando que os marcadores

detectaram alterações moleculares entre DNA tratado e controle negativo ou entre DNA tratado e controle positivo.

Os maiores valores de dissimilaridade e distâncias foram obtidos para o Tebuconazol, indicando que esse princípio ativo causou mais alterações no DNA em relação aos demais princípios e aos controles. Além disso, com o aumento da concentração desse princípio houve aumento das médias de dissimilaridade, obtidas com ISSR, em relação aos controles. Similarmente com SSR, as maiores distâncias foram obtidas para as concentrações C₄ e C₅. Esse resultado sugere um efeito de dose – dependência do princípio, indicando que quanto maior a concentração maior a quantidade de alterações no DNA (Tabela 7).

Os princípios procimidona e iprodiona apresentaram maior quantidade de alterações na maior concentração utilizada (C₅), quando comparadas as dissimilaridades em relação aos controles. Entretanto, na análise feita com SSR o procimidona apresentou maiores alterações nas C₂ e C₄ em relação ao controle negativo. E o princípio ativo iprodiona apresentou maiores efeitos nas C₅, C₁ e C₄, que ficaram mais distantes do controle negativo, respectivamente (Tabela 7).

Diferentemente dos demais, o princípio ativo difenoconazol causou maiores danos ao DNA foram observados na menor concentração utilizada, verificados pelos maiores valores de dissimilaridades e distâncias em relação aos dois controles e às demais concentrações utilizadas.

Tabela 7. Dissimilaridade, obtidas com os ISSR, e distância genética, obtidas com SSR, dos tratamentos de DNAs expostos a diferentes concentrações de quatro princípios ativos e os controles negativo (Co-) e positivo (Co+)

Princípio Ativo / Concentração		ISSR							SSR						
		Co ⁻	Co ⁺	C ₁	C ₂	C ₃	C ₄	C ₅	Co ⁻	Co ⁺	C ₁	C ₂	C ₃	C ₄	C ₅
Difenoconazol	Co ⁻		0,089	0,096	0,084	0,081	0,075	0,055	0	1,406	2,000	0,944	1,500	0,917	0,722
	Co ⁺		0	0,110	0,095	0,094	0,076	0,068		0	3,760	2,705	3,177	1,177	1,733
	C ₁			0	0,070	0,097	0,091	0,081			0	0,778	1,333	2,556	2,389
	C ₂				0	0,096	0,069	0,069				0	0,667	1,556	1,611
	C ₃					0	0,083	0,067					0	2,000	1,944
	C ₄						0	0,048						0	0,500
	C ₅							0							0
Média		0,069	0,076	0,078	0,069	0,074	0,063	0,055	1,070	1,994	1,831	1,180	1,517	1,244	1,271
Tebuconazol	Co ⁻	0	0,089	0,177	0,171	0,216	0,250	0,259	0	1,406	2,000	1,625	1,156	4,000	3,000
	Co ⁺		0	0,169	0,160	0,207	0,228	0,242		0	4,781	4,031	3,813	5,594	6,281
	C ₁			0	0,129	0,188	0,226	0,249			0	1,688	1,125	3,625	1,875
	C ₂				0	0,184	0,229	0,231				0	0,406	2,375	1,875
	C ₃					0	0,212	0,215					0	3,031	1,531
	C ₄						0	0,232						0	2,250
	C ₅														0
Média		0,166	0,157	0,163	0,158	0,174	0,197	0,204	1,884	3,701	2,156	1,714	1,580	2,982	2,402
Procimidona	Co ⁻	0	0,089	0,088	0,091	0,085	0,078	0,122	0	1,406	1,167	1,500	1,111	1,556	1,111
	Co ⁺		0	0,094	0,094	0,096	0,090	0,111		0	2,427	4,094	2,205	1,566	2,122
	C ₁			0	0,079	0,093	0,089	0,122			0	1,556	1,167	1,778	1,278
	C ₂				0	0,096	0,091	0,124				0	1,833	3,222	2,833
	C ₃					0	0,080	0,112					0	1,167	2,000
	C ₄						0	0,103						0	1,833
	C ₅							0							0
Média		0,079	0,082	0,081	0,082	0,080	0,076	0,099	1,122	1,974	1,339	2,148	1,355	1,589	1,597
Iprodiona	Co ⁻	0	0,089	0,091	0,098	0,077	0,076	0,122	0	1,406	1,406	0,875	0,844	1,031	1,375
	Co ⁺		0	0,101	0,109	0,093	0,091	0,143		0	4,188	2,406	1,688	2,875	3,844
	C ₁			0	0,105	0,090	0,092	0,138			0	1,406	1,938	1,125	0,781
	C ₂				0	0,087	0,081	0,135				0	1,531	0,969	0,500
	C ₃					0	0,074	0,116					0	2,500	2,281
	C ₄						0	0,097						0	0,594
	C ₅							0							0
Média		0,079	0,089	0,088	0,088	0,077	0,073	0,107	0,991	2,344	1,549	1,098	1,540	1,299	1,339

Os agrupamentos foram realizados por princípio ativo para cada tipo de marcador (Figura 6).

Os agrupamentos obtidos com os dois tipos de marcadores para o difenoconazol foram similares (Fig. 6 A e 6 E). As concentrações maiores (C₄ e C₅) agruparam-se ao controle negativo. As concentrações C₁ e C₂ formaram um grupo, que na análise com SSR também agrupou a C₃. O controle positivo não se agrupou e causou maior quantidade de alterações em relação às concentrações do princípio ativo utilizado.

Para o tebuconazol no agrupamento com os dados de ISSR (Fig. 6 B), os controles formaram um grupo, as duas menores concentrações outro e as maiores concentrações formaram grupos independentes. A proximidade dos dois controles, o distanciamento das maiores concentrações em relação ao controle negativo aliados aos dados de dissimilaridades vistos anteriormente mostram que o tebuconazol em qualquer concentração foi mais mutagênico que o controle positivo. Com o marcador SSR (Fig. 6 F), o controle negativo agrupou-se com as três menores concentrações e as duas concentrações maiores e o controle positivo não se agruparam.

No agrupamento do princípio ativo procimidona, analisado com ISSR (Fig. 6 C), foram formados o grupo do controle negativo com as C₄ e C₃ e o grupo das menores concentrações. O controle positivo e a C₅ formaram grupos individuais. Com SSR foram detectados um grupo com controle negativo com a maior e menor concentração, outro com C₃ e C₄ e o controle positivo e a C₂ se separaram dos demais.

Para o iprodiona, utilizando o ISSR (Fig. 6 D), foram formados os grupos: C₃, C₄ e controle negativo; C₁, C₂, C₅ e controle positivo não se agruparam. A C₅ foi a mais dissimilar em relação às demais e ao controle. Com os SSR o controle negativo agrupou-se com a C₃, portanto a menos danosa, as demais concentrações se agruparam e o controle positivo não se agrupou (Fig. 6 H).

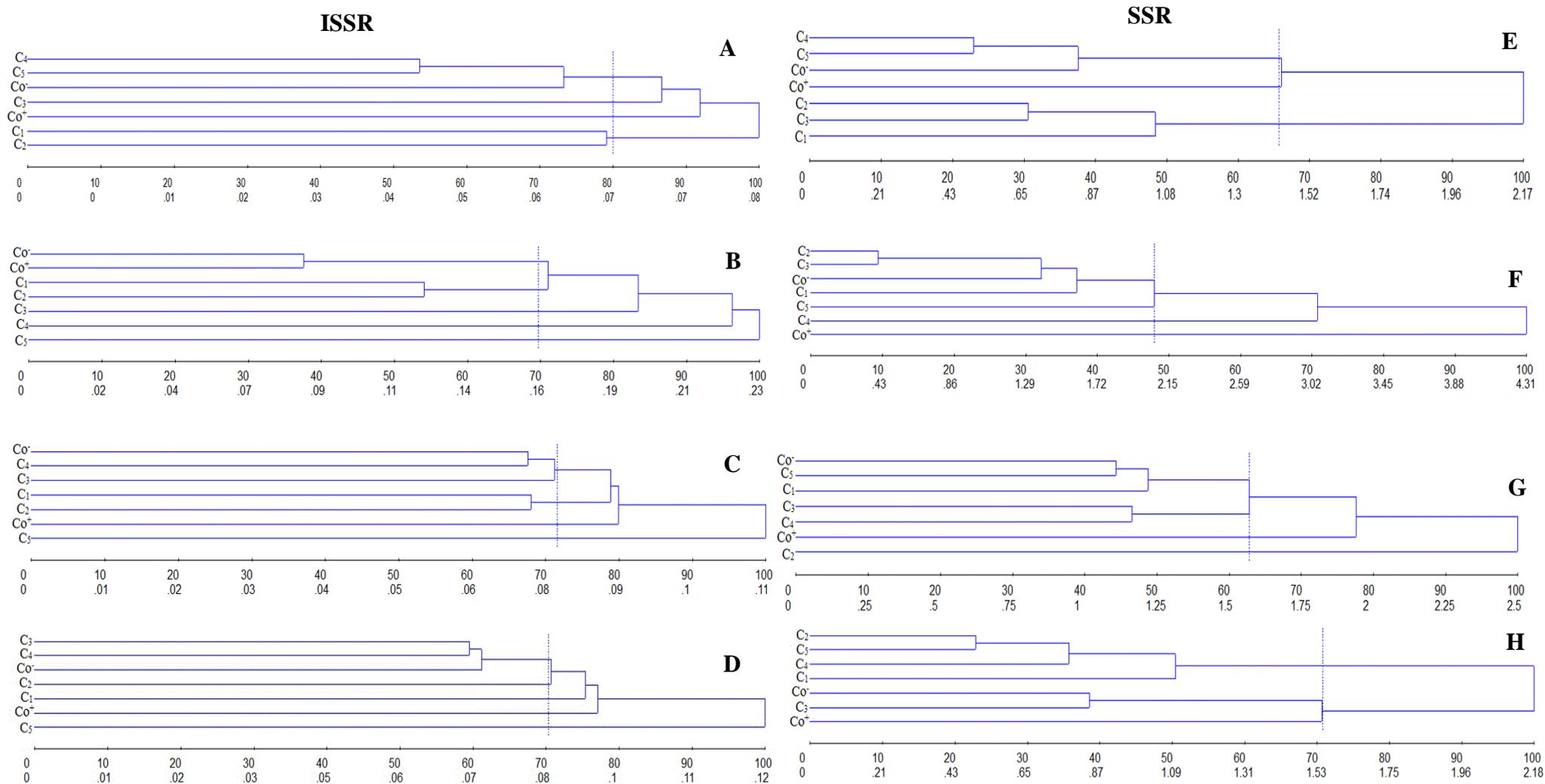


Figura 6. Agrupamento UPGMA de DNAs tratados com diferentes princípios ativos, obtidos de distâncias genéticas e de dissimilaridade para os primers ISSR e SSR. A e E: difenoconazol; B e F: tebuconazol; C e G: procimidona; D e H: iprodiona.

6. DISCUSSÃO

Neste estudo, foram constatados efeitos de toxicidade e fitotoxicidade, citotoxicidade e genotoxicidade, e de mutagenicidade dos princípios ativos avaliados, por análises macroscópicas, microscópicas e moleculares no sistema *Allium cepa*. Esses efeitos foram mais frequentes nas maiores concentrações, sendo o tebuconazol o princípio que ocasionou maiores alterações, mesmo em menores concentrações.

Os ensaios macroscópicos (nos quais foram avaliados germinação e crescimento radicular) e microscópicos (índice mitótico, aberrações nucleares e cromossômicas), baseados nas análises de ponta de raiz, são utilizados em estudos de prospecção de efeitos tóxicos de compostos. Efeitos de retardo na germinação indicam efeito fitotóxico, sendo a redução na frequência de germinação considerada um parâmetro eficiente e sensível na análise de fitotoxicidade (VALERIO et al., 2007). O crescimento radicular está relacionado ao aumento do número e o alongamento das células durante a diferenciação (HARASHIMA; SCHNITTGER, 2010). O aumento no número de células, por sua vez, é dependente da divisão celular mitótica. Logo, os dados macroscópicos possuem correlação com os microscópicos (ANDRADE et al., 2010), uma vez que sucessivos ciclos mitóticos são necessários para a raiz alongar durante um período de tempo.

Neste estudo, foi verificado efeito de dose-dependência nas análises realizadas dos princípios ativos, evidenciado pelo aumento dos danos com aumento das concentrações, a exemplo do crescimento radicular que reduziu com o aumento da concentração. Diferentes trabalhos mostram esse efeito para compostos avaliados em *Allium cepa*, como o cádmio reduziu o crescimento de raízes em maiores concentrações (LIU et al, 2009). O sulfato de cobre causou efeito tóxico devido o atraso no crescimento das raízes, em menores concentrações (YILDIZ et al., 2009). A redução do crescimento radicular pode estar relacionada, além do aumento no número de células, ao processo de alongamento das células (FUSCONI et al., 2006) e à inibição da síntese de proteínas (SETH et al., 2007).

A germinação e o crescimento radicular foram reduzidos nas maiores concentrações dos princípios ativos com exceção do procimidona. O tebuconazol apresentou maior toxicidade, citotoxicidade e mutagenicidade em todas as análises realizadas. Este afetou a germinação das sementes em todas as concentrações, com maior redução a partir da C₃, indicando ação citotóxica e fitotóxica, por impedir a

divisão celular e o desenvolvimento das plântulas. Além disso, também induziu a morte celular, evidenciado pela redução do índice mitótico, pela alta frequência de aberrações nucleares e pela degradação do DNA por morte celular programada (Tabela 4) (Figura 5).

O índice mitótico (IM) teve um decréscimo em relação ao controle negativo para todos os princípios ativos, indicando a ocorrência de efeito citotóxico dos princípios nas raízes, principalmente para o difenoconazol e o tebucoanzol. Citotoxicidade evidenciada pela redução do IM em *Allium cepa* também foi observada pela ação do inseticida carbofuran (SAXENA et al., 2010) e do herbicida atrazina (BOLLE et al., 2004). Nas análises microscópicas o estudo do ciclo celular permite identificar aberrações ocasionadas por compostos tóxicos, pela detecção de anormalidades no índice mitótico, aberrações cromossômicas ou nucleares (KLACKNICK et al., 2011; KUMARI et al., 2011). O tipo de aberração pode determinar o efeito ocasionado pelo composto, podendo ter ação aneugênica e/ou clastogênica (FENECH, 2000).

Houve aumento das frequências das aberrações nucleares e cromossômicas para todos os princípios em relação ao controle negativo. O tebuconazol apresentou mais aberrações cromossômicas nas duas concentrações avaliadas. Os demais princípios a partir da concentração recomendada ou acima desta foram citotóxicos por apresentarem cromossomos perdidos, quebrados e pegajosos, pontes, c-metáfases e c-metáfases poliplóides.

Alterações que promovem modificações no fuso mitótico são conhecidas como aneugênicas. Os princípios ativos difenoconazol, iprodiona e procimidona apresentaram esse tipo de ação devido à alta frequência de c-metáfases, c-metáfase poliplóide e cromossomos pegajosos. As c-metáfases são formadas por bloqueio na estrutura do aparato do fuso que afeta o fuso mitótico, provocando uma divisão celular anormal e formação de células poliploides ou aneuploide, e também pode agir na polimerização e despolimerização dos microtubulos (FENECH, 2000), e as c-metáfases poliploides são originadas após a formação das c-metáfases pela duplicação cromossômicas das células. Efeito aneugênico foi relatado para o composto ativo glifosato do herbicida roundup em raízes de *Allium cepa* (RANK et al, 1994).

Os cromossomos pegajosos, formados por alterações na estrutura dos cromossomos prejudicando sua condensação normal e resultando em aglomerados (BABICH et al., 1997), ocorreram em alta frequência neste estudo. Essa alteração está normalmente associada a um forte efeito citotóxico, é irreversível e pode levar a morte

celular (EL-GHAMERY et al, 2003; FISKEJÖ, 1988, 1995, 1997). Em estudo com o fungicida flusilazole (triazol), a presença de cromossomos pegajosos também foi uma das aberrações mais frequentes (OZAKCA; SILAH, 2013).

O difenoconazol apresentou ação clastogênica pela alta frequência de pontes e fragmentos cromossômicos. Essa ação é caracterizada por causar quebra nos cromossomos (FENECH, 2000). Pontes são formadas por junção das extremidades das cromátides irmãs, ocasionada pela quebra dos telômeros das mesmas, seguida da fusão das extremidades quebradas. Fragmentos são consequências da quebra cromossômica originando fragmentos acêntricos (LEME; MARIN-MORALES, 2008). Clastogenicidade foi relatada para o herbicida pentachlorophenol por causar quebras e pontes (ATEEQ et al., 2002). Para hidrazida maléica (MH), foi observado pontes, micronúcleo e cromossomo isolado em *Allium cepa* (MARCANO et al., 2004).

Para os princípios ativos estudados, as alterações nucleares (AN) foi o parâmetro mais afetado das análises microscópicas, diferindo em todos os casos do controle negativo e na maioria das vezes se igualando ao controle positivo. Além disso, teve alto incremento nas duas menores concentrações do tebuconazol, as únicas que apresentaram raízes suficientes para avaliações desses parâmetros.

Aberrações nucleares são caracterizadas por alterações morfológicas no núcleo interfásico e resultantes da ação tóxica de compostos. São importantes quando analisadas em conjunto com as alterações cromossômicas, tornando os dados mais precisos em relação aos danos causados no DNA dos organismos testes (LEME; MARIN-MORALES, 2009). Neste estudo, as AC e AN apresentaram comportamento similar. Assim, com o aumento da concentração dos princípios ativos houve aumento dessas aberrações em relação ao controle negativo. O mesmo comportamento foi relatado para os herbicidas pentaclofenol, 2,4-D e butaclor (ATEEQ et al, 2002).

Aberrações nucleares foram observadas para todos os princípios ativos e em todas as concentrações. O tebuconazol apresentou altas frequências de aberrações nucleares nas concentrações C₁ e principalmente na C₂, demonstrando morte das células e baixa divisão celular, o que ocasiona aumento no número de núcleos condensados, que tem relação com a baixa porcentagem de germinação, crescimento das raízes e a degradação do DNA por meio da morte celular programada (Fig. 5). A morte celular programada envolve modificações nos processos bioquímicos e morfológicos das células e seus componentes, como degradação do DNA e condensação nuclear (MCCABE, 2010). Núcleos condensados são uma das principais consequências desse

tipo de morte celular, como verificado em estudo com SPL, que demonstrou uma relação entre a condensação de núcleos e a presença de morte celular programada. (ANDRADE-VIEIRA et al., 2011).

Outro tipo de morte celular observada foi a necrose, que é caracterizada pela presença do arraste do DNA em corrida eletroforética, demonstrando que o DNA foi degradado pela ação do princípio ativo tebuconazol na C₅ (Figura 5). A morte celular ocorre como uma forma de defesa da planta, para impedir que o agente cause danos celulares, sendo a necrose considerada um processo de degradação passiva e como consequência dessa degradação promove a ruptura da membrana (XIONG et al., 2006).

É importante considerar que estudos em *Allium cepa* demonstram sempre toxicidade. Alterações no crescimento radicular indicam fitotoxicidade e no índice mitótico indicam citotoxicidade (OLIVEIRA et al., 2011), enquanto que aberrações cromossômicas mostram efeito genotóxico e citotóxico, e aberrações nucleares mostram efeito citotóxico (FISKESJÖ, 1985; LEME; MARIN-MORALES, 2009).

As análises moleculares reforçam e complementam o observado na citogenética, demonstrando os efeitos mutagênicos dos princípios ativos e o modo de ação no DNA, verificado pelo distanciamento das maiores concentrações em relação ao controle negativo e pelo ganho e perdas de bandas com os dois tipos de marcadores. Zhiyi e Haowen (2004) também relataram tal distanciamento entre amostras tratadas e não tratadas usando o marcador RAPD, para avaliar o inseticida dimetoato em peixe-zebra. Enan (2007) relatou distâncias crescentes com o aumento da concentração de paranitrophenol em relação ao controle negativo, usando RAPD. Em mudas de cevadas, Liu et al. (2005) verificaram o desaparecimento de bandas com o aumento da concentração.

Da mesma forma que nas análises macroscópicas e microscópicas, nas moleculares, com os marcadores ISSR e SRR, o tebuconazol foi o princípio que ocasionou maiores danos, dado o distanciamento crescente dos tratamentos em relação ao controle negativo nas maiores concentrações. O mesmo foi verificado para procimidona e iprodiona, com o marcador ISSR. Essa concordância entre análises macroscópicas e moleculares também foi verificada por Liu et al., (2005) que observaram uma redução do crescimento radicular de cevada e aumento de alterações no perfil de DNA obtido por RAPD, com aumento da concentração de cádmio.

Com o marcador SSR, foram observados resultados distintos para os princípios procimidona e iprodiona, em relação às análises macroscópicas e microscópicas, com as

maiores distâncias nas concentrações C₄ e C₁, respectivamente (Tabelas 4, 7). Além disso, diferentemente das análises macro e microscópicas nas quais as maiores concentrações foram as mais danosas, com os dois tipos de marcadores o maior número de alterações no DNA, causados pelo difenoconazol foram detectadas nas menores concentrações. Isso revela que o princípio causou maior quantidade de mutações na sequência de DNA em baixas concentrações, embora maiores danos fitotóxicos e aberrações tenham sido detectados nas maiores concentrações.

Alterações no DNA foram verificadas com análises moleculares que não foram detectadas nas macro e microscópicas, como o ganho e perda de bandas. Mesmo em menores concentrações foram detectadas alterações no DNA, não encontradas nas demais análises. Estudos com RAPD, AFLP e RFLP demonstraram que esses marcadores apresentam maior sensibilidade que os testes clássicos em detectar alterações no DNA (SAVVA, 1998; LABRA et al., 2003).

As alterações e variações no perfil de DNA verificados foram devido ao ganho, perda e mudança na intensidade de fragmentos de DNA amplificados (bandas) por ISSR ou SSR, mostrando que os princípios ativos induziram alterações no DNA em relação ao controle negativo. Perda e ganho de bandas para seis primers de RAPD, em peixes, foram causadas pelo princípio ativo carbofuran (MOHANTY et al., 2009) e variação na intensidade de banda em perfis de RAPD, foram relatados em estudo com cádmio em mudas de cevada (LIU et al., 2005). Barky et al. (2012) verificaram mudanças no padrão de perfis de ISSR e RAPD entre grupos tratados e não tratados, quando avaliaram o efeito dos herbicidas atrazina e roundap em *Biomphalaria alexandrina snails*, incluindo alterações no número, intensidade e posição das bandas.

O ganho e perda de bandas podem estar relacionados à presença de aduto de DNA, impedindo o anelamento do primer e também devido às quebras e mutações no sítio de anelamento, com conseqüente alteração do *fingerprints* do DNA (ENAN, 2007). O aduto é formado pela interação do DNA com substâncias químicas (RIBEIRO, 2004). A base do DNA mais propensa a essa alteração é a guanina, apesar de ser verificado com as outras bases também (DIPPLE, 1995) e os primers ISSR são ricos nessa base. Assim, ganho, perda ou alteração na intensidade de bandas são danos observados nos testes moleculares que evidenciam instabilidade do genoma do organismo a um composto. Essa instabilidade é ocasionada por mutações, principalmente por aquelas que danificam a manutenção da célula em processos de reparo, replicação, recombinação do DNA e divisão celular (FENECH, 2005).

A perda de bandas aconteceu em maior proporção do que o ganho para os nove *primers* de ISSR nos tratamentos com os princípios ativos. A capacidade de detectar mais perdas com o ISSR pode estar relacionada à quantidade de locos em heterozigose que foram afetados no genoma avaliado, assim como o marcador é dominante, a alteração no local de anelamento na sequência de DNA de apenas um dos homólogos seria detectada como desaparecimento. Como o genótipo de cebola utilizado é um híbrido, no qual se espera muitos locos em heterozigose, privilegia esse tipo de detecção. Além disso, esse marcador acessa maior quantidade de locos por vez, em virtude do *primer* se anelar em diferentes locais no genoma.

O ganho de bandas ocorreu em maior frequência para o marcador SSR. Para o SSR, é mais fácil identificar o aparecimento de banda que a perda, pois na exposição de um organismo a um mutágeno algumas células são afetadas e outras não em diferentes locais no cromossomo. Assim, ao extrair DNA de várias células, como dificilmente ocorreria mudança no mesmo lugar no DNA em todas as células, dificultando a identificação de danos em menor grau como a perda de banda, mas não afetando a análise de surgimento de novas bandas, pois o *primer* é específico ao sítio de ligação (SAVVA, 2000).

Estudo realizado com peixe-zebra verificou aumento no aparecimento de bandas por RAPD, mostrando um efeito genotóxico do metilmercúrio (LEREBOURS et al. 2013). Em estudo com cádmio, o surgimento de bandas de RAPD ocorreu nas concentrações de 30, 60 e 120 mg/L de cádmio, e esse evento pode estar relacionado com o processo de reparo do DNA e com processo de replicação nas pontas das raízes de cevada (LIU et al., 2005). O ganho de bandas também pode ocorrer devido à instabilidade do molde genômico relacionados com os danos no DNA ou com a eficiência de reparo e replicação do DNA (ATIENZAR et al., 1999).

Para os marcadores usados, foram observadas mudança na intensidade de banda, tanto em menores como em maiores concentrações. Essa alteração ocorre devido a menor interação do *primer* com o DNA nas fases iniciais de anelamento e de extensão (WELSH et al., 1995) e também à presença de adutos de DNA, que podem inibir ou reduzir a polimerização da DNA durante a PCR (ATIENZAR, JHA, 2006). Em perfis de RAPD, as alterações de intensidade de bandas são amplamente relatadas em DNA's expostos a agentes mutagênicos e genotóxicos (ATIENZAR et al., 2001; ATIENZAR et al, 2002; GUIDA et al., 2010) e ocasionam mutações que modificam a estabilidade do modelo de interação do *primer*, mas não altera a capacidade do *primer* em se anelar

(SAVVA, 2000; JONES; KORTENKAMP, 2000). Mudança de intensidade foi relatado por Liu et al. (2005), com RAPD, em maior quantidade em menores concentrações de cádmio e a redução em maiores concentrações.

Os agrupamentos são realizados por estimativas de distâncias ou dissimilaridades, entre grupos tratados e o controle. Neste estudo, utilizando ISSR e SSR, verificou-se agrupamento de concentrações de acordo com as alterações ocasionadas no DNA, para cada princípio ativo. O marcador ISSR conseguiu diferenciar maior número de grupos dos DNA's tratados em relação ao SSR para os princípios ativos. O fato dos dois tipos de marcadores amostrarem número e regiões distintas no DNA, e dos SSR usados serem relacionados a sequências expressas e os de ISSR não necessariamente, resultados distintos podem ser encontrados.

Em estudo de genotoxicidade em *Eruca sativa*, o marcador ISSR foi reportado como uma poderosa ferramenta na medição quantitativa e qualitativa da atividade genotóxica causada por metais pesados, podendo ser aplicado em diversos organismos testes e na avaliação de poluição ambiental, com potencial para tornar-se uma metodologia universal de identificação de genes alvos específicos de agentes contaminantes (AL-QURAINY, 2010).

O tebuconazol e o difenoconazol formaram grupos semelhantes com os dois marcadores, indicando que os marcadores detectaram alterações similares nos DNA's tratados. Entretanto, grupos diferentes foram obtidos com os dois tipos de marcadores para o procimidona e o iprodiona, demonstrando detecção de alterações distintas. Estudo realizado com metais pesados observou uma relação entre o agrupamento e a distância para o RAPD, pois a maior distância foi verificada na menor concentração de chumbo, indicando que as plantas expostas foram danificadas a nível molecular (ENAN, 2006).

Com o ISSR, foi verificado dose-dependência para todos os princípios, por separar as menores concentrações e o controle negativo das maiores concentrações, mostrando que o aumento da concentração aumentou os danos ocasionados pelos princípios ativos. O mesmo comportamento foi observado para o SSR para o difenoconazol e tebuconazol. Para o procimidona e iprodiona, não foi possível separar as maiores das menores concentrações e do controle negativo para o SSR. Dose-dependência também foi verificada em estudo com RAPD em soja expostas à radiação gama e em feijão com AP-PCR, quando exposto ao paranitrofenol, demonstrando uma

relação entre os grupos formados e a distância nas maiores concentrações de (ENAN, 2007; ATAK et al., 2004).

Com análises de agrupamento, Luan et al. (2012) obtiveram um grupo para o controle e outro para os DNAs tratados usando RAPD. Berckmoes et al. (2005) conseguiram identificar um distanciamento de organismos que habitam locais contaminados em diversos níveis de poluição.

Há poucos relatos de uso de marcador ISSR e SSR para detecção de mutagenicidade. Estes são conhecidos por serem marcadores mais robustos e reprodutíveis, o primeiro dominante e o segundo codominante, permitindo aumentar a confiabilidade dos dados e no caso de codominante acrescentar informações.

Em estudo de genotoxicidade de cádmio em alface, Monteiro et al. (2007) relataram que o SSR é uma ferramenta para auxiliar no esclarecimento de danos causados por agentes genotóxicos. A sensibilidade em detectar pequenas alterações na sequência de DNA foi relatada para esse marcador em estudo com cádmio na análise da instabilidade de microssatélites (EL-GHOR et al., 2010).

Os marcadores ISSR e SSR se destacam por gerar *fingerprints* polimórficos e reprodutíveis (BORNET; BRANCHARD, 2001). Os ISSR são arbitrários e identificam mutações em diferentes locais. Nesse caso, conseguem detectar mutações fora do local de anelamento do *primer*, porque o organismo ao entrar em contato com a substância tóxica, a replicação do DNA e o reparo das células de forma errada ocasionam mutações em quantidades elevadas (BOWDITCH et al., 1993; LIVNEH et al., 1993).

Então, neste estudo, verificou-se correlação entre as análises macroscópicas, microscópicas e moleculares, por meio das alterações observadas, que apresentaram dose-dependência em relação à concentração dos princípios ativos. Os marcadores moleculares ISSR e SSR permitiram detectar as alterações ocasionadas no DNA mesmo em menores concentrações, podendo ser utilizados como ferramentas em estudos de genotoxicidade, pois permitem quantificar os danos causados por substâncias tóxicas, que não são verificadas em análises clássicas.

7. CONCLUSÃO

As análises macroscópicas, microscópicas e moleculares são eficazes em detectar a toxicidade dos fungicidas usados.

As análises macroscópicas, microscópicas e moleculares podem ser utilizadas em conjunto como indicadores confiáveis em detectar danos ocasionados por substâncias químicas potencialmente tóxicas em *Allium cepa*.

Os marcadores moleculares ISSR e SSR podem ser utilizados como ferramenta em análise de mutagenicidade, mostrando ser eficientes em diferenciar as alterações nos perfis de amplificação e podem ser informativos em estudos de genética toxicológica, demonstrando um grande potencial para avaliações de toxicidade.

8. REFERÊNCIAS

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (Anvisa). Agrotóxicos e Toxicologia: Monografia dos Agrotóxicos. Tebuconazol. Resolução 160 de 19 janeiro de 2010. Diário Oficial da União, Brasília, DF. Publicado no DOU de 20 de janeiro de 2010.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (Anvisa). Consulta Pública nº 37, de 17 de maio de 2007. Disponível em: <<http://www.anvisa.gov.br.htm>>. Acesso em: 28 de maio de 2013.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (Anvisa). Consulta Pública nº 37, de 17 de maio de 2003. Disponível em: <<http://www.anvisa.gov.br.htm>>. Acesso em: 28 de maio de 2013.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (Anvisa). Consulta Pública nº 4.446, de 23 de setembro de 2010. Disponível em: <<http://www.anvisa.gov.br.htm>>. Acesso em: 28 de maio de 2013.

AGROFIT; Sistema de Agrotóxicos Fitossanitários, http://extranet.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons - Acessado em setembro de 2013.

AINA, R.; PALIN, L.; CITTERIO, S. Molecular evidence for benzo[a]pyrene and naphthalene genotoxicity in *trifolium repens* l. **Chemosphere**. v. 65, p. 666–673, 2006.

ALBERTINI, R. J.; ANDERSON, D.; DOUGLAS, G. R.; HAGMAR, L.; HEMMINK, K.; MERLO, F.; NATARAJAN, A. T.; NORPPA, H.; SHUKER, D. E.; TICE, R.; WATER, M. D.; AITIO, A. IPCS guideline for the monitoring of genotoxic effects of carcinogens in humans, International Programme on Chemical Safety. **Mutation Research**, v.463, p.111-172, 2000.

AL-QURAINY, F. Application of inter simple sequence repeat (ISSR marker) to detect genotoxic effect of heavy metals on *Eruca sativa* (L.). **African Journal of Biotechnology**, v. 9, n. 4, p. 467-474, 2010.

ANDRADE, C. U. B. Mutagenicidade do estrato de casca de *Musa paradisiaca* (MUSACEAE) em células de sangue periférico de camundongos *in vivo*. 2007. 89 f. Dissertação (Mestrado em saúde) –Universidade José do Rosário Vellano, Alfenas. 2007.

ANDRADE, L. F.; DAVIDE, L. C.; GEDRAITE, L. S. The effect of cyanide compounds, fluorides and inorganic oxides present in spent pot Linner on germination and root tip cells of *Lactuca sativa*. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 25, n. 73, p.626-631, 2010.

ANDRADE-VIEIRA, L. F.; FERREIRA, M. F. S.; BERNARDES, P. M.; OLIVEIRA, W. B. S. Toxicidade de agrotóxicos: uma abordagem citogenética e molecular. In: PRATOSSOLI, D.; JUNIOR, W. C. J.; ZAGO, H. B.; ALVES, F. R.; VIANA, U. R.; JUNIOR, H. J. G. S.; RODRIGUES, C. (Eds). Tópicos Especiais em produção Vegetal III. 1ª edição. Alegre: CAUFES, 2012. p. 837.

ANDRADE-VIEIRA, L.F.; GEDRAITE L. S.; CAMPOS, J. M. S.; DAVIDE, L. C. Spent Pot Linner (SPL) Induced DNA Damage and nuclear alterations in root tip cells of *Allium cepa* as a consequence of programmed cell death. **Ecotoxicology And Environmental Safety**, n. 74, p. 822-828, 2011.

ANVISA. Seminário de mercado de agrotóxico e regulação. ANVISA, Brasília, 11 abril de 2012.

ARRAES, A. I. O. M.; LONGHIN, S. R. Otimização de ensaio de toxicidade utilizando o bioindicador *Allium cepa* como organismo teste . **Enciclopédia Biosfera**, v.8, n.14; p. 1958-1972, 2012.

ATAK, Ç.; ALIKAMANOGLUB, S.; AÇIK, L.; CANBOLAT, Y. Induced of plastid mutations in soybean plant (*Glycine max* L. Merrill) with gamma radiation and determination with RAPD. **Mutation Research**, v. 556, p. 35-44, 2004.

ATEEQ, B.; FARAH, M. A. M.; ALI, N.; AHMAD, W. Clastogenicity of pentachlorophenol, 2,4-D and butachlor evaluated by *Allium* root tip test. **Mutation Research**, v. 514, p. 105–113, 2002.

ATIENZAR, F. A. et al. Comparison of ultraviolet-induced genotoxicity detected by random amplified polymorphic DNA with chlorophyll fluorescence and growth in a marine macroalgae, *Palmaria palmata*. **Aquatic Toxicology**, v. 50, n. 1, p. 1-12, 2000.

ATIENZAR, F. A.; CONRADI, M.; EVENDEN, A. J.; JHA, A. N., DEPLEDGE, M. H. Qualitative assessment of genotoxicity using random amplified polymorphic DNA: comparison of genomic template stability with key fitness parameters in *Daphnia magna* exposed to Benzo[a]pyrene. **Environmenta Toxicology Chemistry**, v. 18, p. 2275–2282, 1999.

ATIENZAR, F. A.; JHA, A. N. The random amplified polymorphic DNA (RAPD) assay and related techniques applied to genotoxicity and carcinogenesis studies: a critical review. **Mutation Research**, v. 613, p. 76-102, 2006.

ATIENZAR, F. A.; JHA, A. N. The random amplified polymorphic DNA (RAPD) assay to determine DNA alterations, repair and transgenerational effects in B(a)P exposed *Daphnia magna*. **Mutation Research**, v. 552, p.125–140, 2004.

ATIENZAR, F. A.; VENIER, P.; JHA, A. N.; DEPLEDGE, M. H. Evaluation of the Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) Assay for the detection of DNA damage and mutations. **Mutation Research**, v. 521, p. 151-163, 2002.

ATIENZAR, F.A.; CHEUNG, V.V.; JHA, A.N.; DEPLEDGE, M.H. Fitness parameters and DNA effects are sensitive indicators of copper induced toxicity in *Daphnia magna*. **Toxicological Sciences**, v. 59, p. 241–250, 2001.

BABICH, H.; SEGALL, M. A.; FOX, K. D. The *Allium* test - a simple, eukaryote genotoxicity assay. **The American Biology Teacher**, v. 59, n. 9, p. 580-583, 1997.

BAGLEY, M. J.; ANDERSON, S. L.; MAY, B. Choice of methodology for assessing genetic impacts of environmental stressors: polymorphism and reproducibility of RAPD and AFLP fingerprints. **Ecotoxicology**, v. 10, p. 239-244, 2001.

BARKY, F. A.; ABDELSALAM, H. A.; MAHMOUD, M. B.; HAMDI, S. A. H. Influence of Atrazine and Roundup pesticides on biochemical and molecular aspects of *Biomphalaria alexandrina* snails. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v.104, p. 9–18, 2012.

BATTAGLIN, A.W.; SANDSTROM, M.W.; KUIVILA, K.M.; KOLPIN, D.N.; MEYER, M.T. Occurrence of azoxystrobin, propiconazole and selected other fungicides in US streams, 2005-2006. **Water, Air, & Soil Pollution**, v. 218, n. 1-4, p. 307-322, 2011.

BENASSI, J. C. *O uso de bioindicadores e biomarcadores na avaliação do processo de remediação de efluente de lixiviação de carvão mineral utilizando microesferas de quitosana*. 2004. 106 f. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2004.

BERCKMOES, V.; SCHEIRS, J.; JORDAENS, K.; BLUST, R.; BACKELJAU, T.; VERHAGEN, R. Effects of environmental pollution on microsatellite DNA diversity in wood mouse (*Apodemus sylvaticus*) populations. **Environmental Toxicology Chemistry**, v. 24, p. 2898-2907, 2005.

BOLLE, P.; S. et al. Clastogenicity of atrazine assessed with the *Allium cepa* test. **Environmental Molecular Mutagenesis**, v. 43, p.137-141, 2004.

BOLOGNESI, C. Genotoxicity of pesticides: a review of human biomonitoring studies. **Mutation Research**, v. 543, p. 251-272, jun. 2003.

BORNET, B.; BRANCHARD, M. Nonanchored Inter Simple Sequence Repeat (ISSR) Markers: Reproducible and Specific Tools for Genome Fingerprinting. **Plant Molecular Biology Reporter**, v. 19, p. 209-215, 2001.

BOWDITCH, B. M., ALBRIGHT, D. G., WILLIAMS, J. G. K. AND BRAUN, M. J. Use of randomly amplified polymorphic DNA markers in comparative genome studies. **Methods in Enzymology**, v.224, p. 294-309, 1993.

BRAIBANTE, M. E. F.; ZAPPE, J. A. A Química dos Agrotóxicos. **Química Nova na Escola**, v. 34, nº 1, p. 10-15, 2012.

BRASIL. Lei nº 7.802 de 11 de julho de 1989 - Decreto n.º 4.074, de 4 de janeiro de 2002. Dispõe sobre a pesquisa, a experimentação, a produção, a embalagem e rotulagem, o transporte, o armazenamento, a comercialização, a propaganda comercial, a utilização, a importação, a exportação, o destino final dos resíduos e embalagens, o registro, a classificação, o controle, a inspeção e a fiscalização de agrotóxicos, seus componentes e afins. Diário Oficial, Brasília; 08 de janeiro de 2002.

BRASIL. Sistema integrado de informações sobre agrotóxicos – SIA. Decreto 4.074, 2002. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/agrosia/asp/default.asp>. Acesso em: 22 junho de 2013.

BRYANT, P. E. Fundamental and molecular mechanisms of mutagenesis. **Mutation Research**, v. 404, n. 1-2, p. 107-111, 1998.

BUHULIKAR, R. A.; STANCULESCU, D.; PRESTON, C. A.; BALDWIN, I. T. ISSR and AFLP Analyses of the Temporal and Spatial Population Structure of the Post-fire Annual *Nicotiana attenuate* in SW Utah, **BMC. Ecology**, v. 4, p. 1-3, 2004.

BUSO, G.S.C.; CIAMPI, A.Y.; MORETZSOHN, M.C.; AMARAL, Z.P.S.; BRONDANI, R.V. Marcadores Microsatélites em Espécies Vegetais. **Biotecnologia, Ciência e Desenvolvimento**, n. 30, p. 46-50, 2003.

CAIXETA, E. T. et al. Tipos de Marcadores moleculares. In: CAIXETA, E. T.; BORÉM, A. (Eds). Marcadores Moleculares. Viçosa: UFV, 2006. p. 9-78.

CARSON, R. **Primavera Silenciosa**. 1 ed. São Paulo: Gaia, 2010.

CONTE, C.; MUTTI, I.; PUGLISI, P. DNA fingerprinting analysis by a PCR based method for monitoring the genotoxic effects of heavy metals pollution. **Chemosphere**, v. 37, p. 2739–2749, 1998.

CRUZ, COSME DAMIÃO. GENES - a software package for analysis in experimental statistics and quantitative genetics. **Acta Scientiarum. Agronomy (Online)**, v. 35, p. 271-276, 2013.

DORNFELD, C. B. Utilização de análises limnológicas, bioensaios de toxicidade e macroinvertebrados bentônicos para o diagnóstico ambiental do reservatório de Salto Grande (Americana, SP). 2002. Tese (Doutorado) - Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Paulo. 2002.

DIPPLE, A. DNA adducts of chemical carcinogens. **Carcinogenesis**, v. 16, n. 3, p. 437, 1995.

DOYLE, J. J.; DOYLE, J. L. Isolation of plant DNA from fresh tissue. **Focus**, p. 13-15, 1990.

EHR, R. J.; KEMMITT, G. Periodic table of the fungicides. Indianapolis: Dow agrosiences. 2002.

EISENBRAND, G.; POOL-ZOBEL, B.; BAKER, V.; BALLS, M.; BLAAUBOER, B. J.; BOOBIS, A.; CARERE, A.; KEVEKORDES, S.; LHUGUENOT, J. C.; PIETERS, R.; KLEINER, J. Methods of *in vitro* toxicology. **Food na Chemical Toxicology**, v. 40, p. 193-236, 2002.

EL-GHAMERY, A. A.; EL-KHOLY, M. A.; EL-YOUSER, M. A. A. Evaluation of cytological effects of Zn²⁺ in relation to germination and root growth of *Nigella sativa* L. and *Triticum aestivum* L. **Mutation Research**, v. 537, n. 1, p. 29-41, 2003.

EL-GHOR, A.; NOSHY, M. M.; EL ASHMAOUI, H. M.; EID, J. I.; HASSANANE, M. S. Microsatellite instability at three microsatellite loci (D6mit3, D9mit2 and

D15Mgh1) located in different common fragile sites of rats exposed to cádmium. **Mutation Research**, v. 696, p. 160–166, 2010.

ENAN, M. R. Application of random amplified polymorphic DNA (RAPD) to detect the genotoxic effect of heavy metals. **Biotechnology and Applied Biochemistry**, v. 43, p. 147–154, 2006.

ENAN, M. R. Assessment of Genotoxic Activity of Para-nitrophenol in Higher Plant Using Arbitrarily Primed-polymerase Chain Reaction (AP-PCR). **American Journal of Biotechnology and Biochemistry**, v.3, n. 2, p. 103-109, 2007.

FALEIRO, F. G. Marcadores genético-moleculares aplicados a programas de conservação e uso de recursos genéticos. Planaltina: Embrapa Cerrados, 2007. 102p.

FENECH, M. The genome health clinic and genome health nutrigenomics concepts: diagnosis and nutritional treatment of genome and epigenome damage on an individual basis. **Mutagenesis**, v.20, n.4, p. 255-69, 2005.

FENECH, M., The in vitro micronucleus technique. **Mutation Research**, v. 455, p. 81-95, 2000.

FERNANDES, T. C. C.; MAZZEO, D. E. C.; MARIN-MORALES, M. A. Mechanism of micronuclei formation in polyploidized cells of *Allium cepa* exposed to trifluralin herbicide. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v.88, n.3, p. 252- 259, 2007.

FERREIRA, M. E.; GRATTAPAGLIA, D. Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética. Brasília: Embrapa-CENARGEN, 1998. 220p.

FISKESJÖ, G. Allium test for screening chemicals; evaluation of cytological parameters. In: WANG et al. **Plants for environmental studies**, 1997 - CRC Press, Florida.

FISKESJÖ, G. *Allium* test In-Methods in Molecular Biology. In-Vitro Toxicity Testing Protocols. Edited by: S.O'Hare and K.C. Atterwill, Humana Press Inc., Totowa NJ, v. 43. 1995.

FISKESJÖ, G. The *Allium* test as a standard in environmental monitoring. **Hereditas**, v. 102, n. 1, p. 99-112, 1985.

FISKESJÖ, G. The *Allium* test: an alternative in environmental studies: the relative toxicity of metal ions. **Mutation Research**, v. 197, n. 2, p. 243-260, Feb. 1988.

FREITAS, L. B. O.; RUELA, F. A.; FERREIRAS, G. R.; ALVES, R. B.; FREITAS, R. P.; SANTOS, L. J. **Química Nova**, v. 34, p. 191-1804, 2011.

FUSCONI, A.; REPETTO, O.; BONA, E.; MASSA, N.; GALLO, C.; DUMAS-GAUDOT, E.; BERTA, G. Effect of cadmium on meristem activity and nucleus ploidy in roots of *Pisum sativum* L. cv. Frisson seedlings. **Environmental and Experimental Botany**, v. 58, p. 253–260, 2006.

GARCIA, J. C. Degradação fotocatalítica artificial e solar de efluentes têxteis por processos oxidativos avançados utilizando TiO₂. 2006. 180f. Tese (Doutorado)-Universidade Estadual de Maringá, Paraná. 2006.

GOPALAN, H. N. B. Ecosystem health and human wellbeing: the mission of the international programme plant bioassays. **Mutation Research**, v.426, p.99–102, 1999.

GRANT, W. F. The present status of higher plant bioassay for detection of environmental mutagens. **Mutation Research**, v. 310, n. 2, p. 175-185, 1994.

GRANT, W.F. Cytogenetic studies of agricultural chemicals in plants. In: FLECK, R.A.; HOLLAENDER, A. (Ed.). Genetic toxicology: an agricultural perspective. New York: Plenum Press, 1982. p. 353-378.

GRÜTZMACHER, D. D.; GRÜTZMACHER, A. D.; AGOSTINETTO, D.; LOECK, A. E.; ROMAN, R.; PEIXOTO, S. C.; ZANELLA, R. Monitoramento de agrotóxicos em

dois mananciais hídricos no sul do Brasil. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v. 12, n. 6, p. 632-637, 2008.

GUIDA, M.; GUIDA, M.; FELICE, B. de; SANTAFE de, D.; D’ALESSANDRO, R.; SARDO, A. di S.; SCOGNAMIGLIO, M.; FERRARA, C.; BIFULCO, G.; NAPPI, C. Assessment of DNA Damage by RAPD in *Paracentrotus lividus* embryos exposed to amniotic fluid from residents living close to Waste Landfill sites. **Journal of Biomedicine and Biotechnology**, v. 2010, p. 7, 2010.

HAGGER, J. A., ATIENZAR, F. A.; JHA, A. N. Genotoxic, cytotoxic, developmental and survival effects of tritiated water in the early life stages of the marine mollusc, *Mytilus edulis*. **Aquatic Toxicology**, v.74, p. 205–217, 2005.

HARASHIMA, H.; SCHNITTGER, A., The integration of cell division, growth and differentiation. **Current Opinion in Plant Biology**. v. 13, p. 66–74, 2010.

HODGSON, E. In: *A Textbook of Modern Toxicology*; Hodgson, E. (Ed). 3^a ed., John Wiley & Sons: New Jersey, 2004, cap. 1.

JAKSE, J.; MARTIN, W.; MCCALLUM, J.; HAVEY, M.J. Single nucleotide polymorphisms, indels, and simple sequence repeats for onion cultivar identification. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, v.130, p.912-917, 2005.

JAMES, R. C.; ROBERTS, S. M.; WILLIAMS, P. L. In: *Principles of Toxicology: Environmental and Industrial Applications*; WILLIAMS, P. L.; JAMES, R. C.; ROBERTS, S. M., eds.; 2nd ed., John Wiley & Sons: New York, 2000, cap. 1.

JHA, A.N. Genotoxicological studies in aquatic organisms: na overview. **Mutation Research**, v. 552, p. 1–17, 2004.

JONES, C.; KORTENKAMP, A. RAPD Library fingerprinting of bacterial and human DNA: applications in mutation detection. **Teratogenesis, Carcinogenesis, and Mutagenesis**, v. 20, p. 49-63, 2000.

KLANCNIK, K.; DROBNE, D.; VALANT, J.; DOLENC KOCE, J. Use of modified *Allium* test with nanoTiO₂. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 74, p. 85-92, 2011.

KRÜGER, R.A. *Análise da toxicidade e da genotoxicidade de agrotóxicos utilizados na agricultura utilizando bioensaios com Allium cepa*. 2009. 43p. Dissertação (Mestrado em Qualidade Ambiental) - Centro Universitário Feevale, Novo Hamburgo, 2009.

KUMARI, M.; KHAN, S.S.; PAKRASHI, S.; MUKHERJEE, A.; CHANDRASEKARAN, N. Cytogenetic and genotoxic effects of zinc oxide nanoparticles on root cells of *Allium cepa*. **Journal of Hazardous Materials**, v. 190, p. 613-621, 2011.

LABRA, M.; FABIO, T. D.; GRASSI, F.; REGONDI, S. M. G. AFLP analysis as biomarker of exposure to organic and inorganic genotoxic substances in plants. **Chemosphere**, v. 52, p. 1183–1188, 2003.

LABRA, M.; GRASSI, F.; IMAZIO, S.; DI FABIO, T.; CITTERIO, S.; SGORBATI, S.; AGRADI, E. Genetic and DNA-Methylation changes induced by potassium dichromate in *Brassica napus* L. **Chemosphere**, v. 54, p. 1049-1058, 2004.

LEME, D. M.; ANGELIS, D. F.; MARIN-MORALES, M. A. Action mechanisms of petroleum hydrocarbons present in waters impacted by an oil spill on the genetic material of *Allium cepa* root cells. **Aquatic Toxicology**, v.88, n. 4, p. 214–219, 2008.

LEME, D. M.; MARIN-MORALES, M. A. Avaliação da Qualidade de Águas Impactadas por Petróleo por Meio de Sistema-Teste Biológico (*Allium cepa*) - Um Estudo de Caso. Universidade Estadual Paulista (UNESP). 4º PDPETRO, Campinas, SP, p. 21-24. 2007.

LEME, D. M.; MARIN-MORALES, M. A. Chromosome aberration and micronucleus frequencies in *Allium cepa* cells exposed to petroleum polluted water—A case study. **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 650, n. 1, p. 80-86, 2008.

LEME, D.M.; MARIN-MORALES, M. A. *Allium cepa* test in environmental monitoring: a review on its application. **Mutation Research**, v. 682, p. 71-81, 2009.

LEREBOURS, A.; CAMBIERB, S.; HISLOP, L.; ADAM-GUILLERMINA, C.; BOURDINEAUD, J.P. Genotoxic effects of exposure to waterborne uranium, dietary methylmercury and hyperoxia in zebrafish assessed by the quantitative RAPD-PCR method. **Mutation Research**, v. 755, p. 55– 60, 2013.

LIU, W.; LI, P. J.; QI, X. M.; ZHOU, Q. X.; ZHENG, L.; SUN, T. H.; YANG, Y.S. DNA changes in barley (*Hordeum vulgare*) seedlings induced by cadmium pollution using RAPD analysis. **Chemosphere**, v. 61, p. 158–167, 2005.

LIU, W.; YANG, Y. S.; LI, P. J.; ZHOU, Q. X.; XIE, L. J.; HAN, Y. P. Risk assessment of cadmium-contaminated soil on plant DNA damage using RAPD and physiological indices. **Journal of Hazardous Materials**, v. 161, p. 878–883, 2009.

LIVNEH, Z.; COHEN-FIX, O.; SKALITER, R.; ELIZUR, T. Replication of damaged DNA and the molecular mechanism of ultraviolet light mutagenesis. **Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology**, v. 28, p. 465-513, 1993.

LUAN, L. Q.; UYEN, N. H. P.; HA, V. T. T. In vitro mutation breeding of *Paphiopedilum* by ionization radiation. **Scientia Horticulturae**, v. 144; p. 1–9, 2012.

MAGALHÃES, D. P.; FERRÃO FILHO, ALOYSIO S. A ecotoxicologia como ferramenta no biomonitoramento de ecossistemas aquáticos. **Oecologia Brasiliensis**, v. 12, n. 3, p. 355-381, 2008.

MARCANO, L. L.; CARRUYO, I.; DEL CAMPO, A.; X. MONTIEL. Cytotoxicity and mode of action of maleic hydrazide in root tips of *Allium cepa*. **Environmental Research**, v. 94, p. 221–226, 2004.

MARTIN, W.J.; MCCALLUM, J.; SHIGYO, M.; JAKSE, J.; KUHL, J. C.; YAMANE, N.; PITHER-JOYCE, M.; GOKCE, A. F.; SINK, K. C.; TOWN, C. D.; Havey, M. J.

Genetic mapping of expressed sequences in onion and *in silico* comparisons with rice show scant colinearity. **Molecular Genetics and Genomics**, v. 274, p. 197-204, 2005.

MATSUMOTO, S. T.; MARIN-MORALES, M. A. Mutagenic potential evaluation of the water of a river that receives tannery effluents using the *Allium cepa* test system. **Cytologia**, v.69, n.4, p.399-408, 2004.

MATSUMOTO, T. S.; MANTOVANI, M. S.; MALAGUTTII, M. I. A.; DIAS, A. L.; FONSECA, I. C.; MARIN-MORALES, M. A. Genotoxicity and mutagenicity of water contaminated with tannery effluents, as evaluated by the micronucleus test and comet assay using the fish *Oreochromis niloticus* and chromosome aberrations in onion root-tips. **Genetics and Molecular Biology**, v. 29, n°. 1, p. 148-158, 2006.

MCCABE, P. F.; EAPE, T. J. Apoptotic-like regulation of programmed cell death in plants. **Apoptosis**. Dublin, p.m1-8, 2010.

MENGONI, A.; GONNELLI, C.; GALARDI, F.; GABBRIELLI, R. Genetic diversity and heavy metal tolerance in populations of *Silene paradoxa* L. (Caryophyllaceae): a random amplified polymorphic DNA analysis. **Mol. Ecol.**, v. 9, p. 1319–1324, 2000.

MOHANTY, G.; MOHANTY, J.; GARNAYAK, S. K.; DUTTA, S. K. PCR based detection of furadan genotoxicity effects in rohu (*Labeo rohita*) fingerlings. **Veterinary research communications**, v. 33, n. 7, p. 771-780, 2009.

MONARCA, S. et al. The influence of diferente disinfectants on mutagenicity and toxicity of urban wastewater. **Water Research**, v. 34, n. 17, p. 4261-4269, 2000.

MONTEIRO, M. S.; LOPES, T.; MANN, R. M.; PAIVA, C.; SOARES, A. M. V. M.; SANTOS, C. Microsatellite instability in *Lactuca sativa* chronically exposed to cadmium. **Mutation Research: Genetic Toxicology and Environmental**, v.672, n.2, p.90-94, 2009.

MONTEIRO, M. S.; SANTOS, C; MANN, R. M.; SOARES, A. M. V. M.; LOPES, T. Evaluation of cadmium genotoxicity in *Lactuca sativa* L. Using nuclear

microsatellites. **Environmental and Experimental Botany**, v. 60, n. 3, p. 421-427, 2007.

MOSER, V. C.; BARONE, S. J. R.; SMIALOWICZ, R. J.; HARRIS, M. W.; DAVIS, B. J.; OVERSTREET, D.; MAUNEY, M.; CHAPIN, R. E. The effects of perinatal tebuconazole exposure on adult neurological, immunological, and reproductive function in rats. **Toxicol Sci**, v. 62, n. 2, p. 339-352, 2001.

NARWAL, S. S.; SAMPIETRO, D. A.; CATA, C. A. A. Chapter 1: Laboratory Bioassays in Allelopathy. In: S. S. Narwal, C. A. N. Catalán, D.A. Sampietro, M. A. Vattuone, B. Politycka,(Org.). Plant Bioassays. Houston: Studium Press, 2008, p. 1-344.
NOEL, S.; RATH, S.K. Randomly amplified polymorphic DNA as a tool for genotoxicity: an assessment. **Toxicology and Industrial Health**, v. 22, n. 6, p. 267-275, 2006.

OBE, G.; JOHANNES, C.; SCHULTE-FROHLINDE, D., DNA double-strand breaks induced by sparsely ionizing radiation and endonucleases as critical lesions for cell death, chromosomal aberrations, mutations and oncogenic transformation, **Mutagenesis**, v. 7, n. 1, p. 3-12, 1992.

OLIVEIRA, L. M.; VOLTOLINI, J. C.; BARBÉRIO, A. Potencial mutagênico dos poluentes na água do rio Paraíba do Sul em Tremembé, SP, Brasil, utilizando o teste *Allium cepa*. **Ambi-Agua**, Taubaté, v. 6, n. 1, p. 90- 103, 2011.

OZAKCA, D. U.; SILAH, H. Genotoxicity effects of Flusizole on the somatic cells of *Allium cepa*. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 107, p. 38-43, 2013.

PAIVA, C.; MONTEIRO, MARTA; SANTOS, CONCEIÇÃO; LOPES, TINA. Evaluation of microsatellite instability (MSI) in *Lactuca sativa* exposed to cadmium. Congresso de Bioquímica, Universidade de Aveiro, Portugal, (2006).

PATRA, M.; SHARMA, A. Relative efficacy of *Allium cepa* and *Allium sativum* in anaphase-telophase test screening metal genotoxicity. **Biologia**, v.57, p.409-414, 2002.

PERES, F.; MOREIRA, J. C. É veneno ou é remédio? Agrotóxicos, saúde e ambiente. Rio de Janeiro: Fiocruz; 2003.

PERES, F.; MOREIRA, J. C. É veneno ou é remédio? Agrotóxicos, saúde e ambiente. Rio de Janeiro: Fiocruz; 2003.

PÉREZ, D. J.; LUKASZEWICZ, G.; MENONE, M. L.; CAMADRO, E. L. Sensitivity of *Bidens laevis* L. to mutagenic compounds. Use of chromosomal aberrations as biomarkers of genotoxicity. **Environmental Pollution**, v. 159, p. 281-286, 2011.

PFEIFFER, P., GOEDECKE, W., OBE, G., Mechanisms of DNA double-strand break repair and their potential to induce chromosomal aberrations. **Mutagenesis**, v. 15, n. 4, p. 289-302, 2000.

QARI, S. H. M. Detection of DNA damage in *Allium cepa* root cells after exposure to Carbofuran using RAPD assay. **Journal Applications Science**, v.1, n. 1, p. 45-57, 2009.

QARI, S. H. M. DNA-RAPD Fingerprinting and Cytogenetic Screening of Genotoxic and Antigenotoxic Effects of Aqueous Extracts of *Costus Speciosus* (Koen.). **Science**, v. 22, n. 1, p: 133-152, 2010.

QUINZANI-JORDÃO, B. *Ciclo celular em meristemas. La formación de intercambios entre cromátidas hermanas.* 1978. 276 f. Tese (Doutorado) - Universidade de Complutense, Madrid, 1978.

RAND, G. M. Fundamentals of aquatic toxicology: effects, environmental fate, and risk assessment. 2^aed., Washington: Taylor & Francis.2000.

RANK, J.; NIELSEN, M. H. Genotoxicity testing of wastewater sludge using *Allium cepa* anaphase-telophase chromosome aberration assay. **Mutation Research**, v. 418, p.113-119, 1998.

RANK, J.; NIELSEN, M.H. Evaluation of the *Allium* anaphase–telophase test in relation to genotoxicity screening of industrial wastewater. **Mutation Research**, v.312, p. 17–24, 1994.

RIBO, J. M. Interlaboratory comparison studies of the luminescent bacteria toxicity bioassay. **Environmental toxicology and water quality**, v. 12, n. 4, p. 283-294, 1997.

RIBEIRO, L. R. Mecanismo de mutagênese e carcinogênese ambiental. I Fórum Multidisciplinar sobre Ciência, Meio Ambiente e Câncer. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v.50, n.2, p. 139-175, 2004.

SAVVA, D. The Use of Arbitrarily Primed PCR (AP-PCR) Fingerprinting to Detect Exposure to Genotoxic Chemicals. **Ecotoxicology**, v.9, p. 341-353, 2000.

SAVVA, D. Use of DNA fingerprinting to detect genotoxic effects. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 41, p. 103-106, 1998.

SAXENA, P.N.; GUPTA, S.K.; MURTHY, R.C. Carbofuran induced cytogenetic effects in root meristem cells of *Allium cepa* and *Allium sativum*: A spectroscopic approach for chromosome damage. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 96, p. 93–100, 2010.

SETH, C.S.; CHATURVEDI, P.K.; MISRA, V. Toxic effect of arsenate and cadmium alone and in combination on Giant Duckweed (*Spirodela polyrrhiza* L.) in response to its accumulation. **Environmental Toxicology**, v. 22, p. 539–549, 2007.

SHEEHAN, D. J.; HITCHCOCK, C. A.; SIBLEY, C. M. Current and emerging azole antifungal agents. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 12, p. 40-79, 1999.

SILVA, D.R.O.; AVILA, L.A.; AGOSTINETTO, D.; DAL MAGRO, T.; OLIVEIRA, E.; ZANELLA, R.; NOLDIN J. A. Monitoramento de agrotóxicos em águas superficiais de regiões orizícolas no sul do Brasil. **Ciência Rural**, v.39, n. 9, p. 2383-2389, 2009.

SILVEIRA, S. B. da. Toxicidade do tebuconazol em quatro espécies fitoplanctônicas dulcícolas subtropicais. 2012. 57 f. Dissertação (Mestrado em Biologia de Ambientes Aquáticos Continentais) - Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande. 2012.

SOARES, A. A. *Resíduos de agrotóxicos organohalogenados em morango por cromatografia à gás: validação de metodologia e ocorrência no Estado de Minas Gerais*. 2011. 100 f. Dissertação (Mestrado em Farmácia) - Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte. 2011.

SON, J. H.; PARK, K. C.; LEE, S. I. L.; KIM, J. H.; KIM, N. S. Species Relationships among *Allium* Species by ISSR Analysis. **Horticulture Environment Biotechnology**, v.5, n.º. 3, p. 256-262, 2012.

SUMNER, A.T. Chromosomes Organization and Function. North Berwick: Reino Unido: Blackwell Publishing, 2003, 287p.

SYNGENTA. **Score**. Disponível em: <www.syngenta.com.br/website/...e.../fungicidas/>. Acesso em: 05 agosto de 2013.

TAXVIG, C.; HASS, U.; AXELSTAD, M.; DALGAARD, M.; BOBERG, J.; ANDEASEN, H. R.; VINGGAARD, A. M. Endocrine-disrupting activities in vivo of the fungicides tebuconazole and epoxiconazole. **Toxicological Sciences**, v. 100, n. 2, p. 464-73, 2007.

TEBUCO. Concentração Emulsionável. Arapongas, PR. NORTOX. 2010. Bula.

TEDESCO, S. B.; LAUGHINGHOUSE, I.V. H.D. Bioindicator of genotoxicity: the *Allium cepa* test. In: SRIVASTAVA, J. K. (Ed). Environmental Contamination. Rijeka: InTech Publisher, 2012. p. 137–56.

THEODORAKIS, C.W. Integration of genotoxic and population genetic endpoints in biomonitoring and risk assessment. **Ecotoxicology**, v.10, p. 245–256, 2001.

THIRIOT-QUIÉVREUX, C. Review of the literature on bivalves cytogenetics in the last ten years. **Cahiers de Biologie Marine**, v. 43, p. 17-26, 2002.

TÓTH, G.; GÁSPARI, Z.; JURKA, J. Microsatellites in Different Eukaryotic Genomes: Survey and Analysis. **Genome Res**, v. 10, p. 967-981, 2000.

VALERIO, M. E., GARCIA, J. F., PEINADO, F. M. Determination of phytotoxicity of soluble elements in soils, based on a bioassay with lettuce (*Lactuca sativa* L.). **Science Total Environment**, v.378, p.63–66, 2007.

VEIGA, M. M. Agrotóxicos: eficiência econômica e injustiça socioambiental. **Agricultura**, v. 379, n. 3, p. 145-152, 2007.

WELSH, J.; PERUCHO, M.; PEINADO, M.; RALPH, D.; MCCLELLAND, M. Fingerprinting of DNA and RNA using arbitrarily primed PCR, in: M.J. McPherson, B.D. Hames, G.R. Taylor (Eds.), *PCR 2 Practical approach*. New York: Oxford University Press Inc., 1995. p. 197–218.

WOLF, H. De; BLUST, R.; BACKELJAU, T. The population genetic structure of *Littorina littorea* (Mollusca: Gastropoda) along a pollution gradient in the Scheldt estuary (The Netherlands) using RAPD analysis. **Science Total Environment**, v. 325, p. 59-69, 2004.

XIONG, H.; LI, Y.; LI, L. A unique form of cell death occurring in meristematic root tips of completely submerged maize seedlings. **Plant Science**, v. 171, p. 624–631, 2006.

YANG, Y.; YAO, J.; HU, S.; QI, Y. Effects of agricultural chemicals on DNA sequence diversity of soil microbial community: a study with RAPD Marker. **Microbial Ecology**, v. 39, 72-79, 2000.

YILDIZ, M.; CIGERCI, I. H.; KONUK, M.; FIDAN, A.F.; TERZI, H. Determination of genotoxic effects of copper sulphate and cobalt chloride in *Allium cepa* root cells by chromosome aberration and comet assays. **Chemosphere**, v. 75, p. 934–938, 2009.

YOUNG, B. J. et al. Toxicity of the effluent from an anaerobic bioreactor treating cereal residues on *Lactuca sativa*. **Ecotoxicology and environmental safety**, v. 76, p. 182-186, 2012.

ZAKRZEWSKI, S. F. *Principles of Environmental Toxicology*, American Chemical Society: Washington, 1994.

ZAMBOLIM, L.; JESUS, J. R. W.C. O essencial dos fungicidas empregados no controle de doenças –parte básica. pp. 77-148 In: ZAMBOLIM, L.; PICANÇO, M. C.; SILVA, A. A.; FERREIRA, L. A.; FERREIRA, F. A.; JESUS JR., W. C. (Eds). *Produtos Fitossanitários (Fungicidas, Inseticidas, Acaricidas e Herbicidas)*. Viçosa, MG: UFV/ DFP, 2008. 652p.

ZHIYI, R.; HAOWEN, Y. A method for genotoxicity detection using random amplified polymorphism DNA with *Danio rerio*. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 58, v.1, p. 96–103, 2004.