

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

EFFECTOS PRODUCIDOS POR VARIOS ALCOHOLES SOBRE LOS
CROMOSOMAS DE LA RAIZ DE Vicia faba.

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL TITULO DE

BIOLOGO

PRESENTA

SANDRA LUZ GOMEZ ARROYO.

MEXICO, D.F., ABRIL DE 1974.



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

A MIS PADRES

A MIS ABUELOS

A JORGE ALBERTO

La presente tesis fué elaborada en el Laboratorio de Genética y Radiobiología del Instituto de Biología de la Universidad Nacional Autónoma de México.

Agradezco la orientación y colaboración de todos los compañeros del laboratorio, que en una u otra forma me ayudaron y especialmente a:
Dr. Rafael Villalobos Pietrini.
M. en C. Abraham Rubluo Islas.
M. en C. Guadalupe Palomino y
Dra. Cristina Pérez Amador.

I N D I C E

INTRODUCCION	5
MATERIAL Y METODOS	11
RESULTADOS	13
TABLAS, GRAFICAS Y FOTOGRAFIAS	15
DISCUSION Y CONCLUSIONES	25
APENDICE I	28
APENDICE II	29
REFERENCIAS	30

EFFECTOS PRODUCIDOS POR VARIOS ALCOHOLES SOBRE LOS CROMOSOMAS DE LA RAIZ DE Vicia faba.

INTRODUCCION

Se han utilizado la frecuencia y el tipo de aberraciones cromosómicas como criterio para reconocer el daño citológico producido, tanto por las radiaciones (Catcheside, 1948; Bacq y Alexander, 1955; Villalobos-Pietrini, 1967) como por los agentes químicos (Auerbach, 1950; Oehlers, 1953; Kihlman, 1966). También han sido elementos efectivos en citogenética para analizar el comportamiento de los cromosomas en la división celular en general y en la sinapsis en particular (Dobzhansky, 1931).

El haba (Vicia faba) se ha considerado como un material útil en estudios de citogenética debido a que sus cromosomas son pocos ($2n=12$), muy grandes y por lo tanto fácilmente observables. Su cariotipo normal está constituido por un par de grandes cromosomas submetacéntricos y cinco pares de cromosomas subacrocentricos. En los brazos cortos de los cromosomas submetacéntricos se presenta una constricción secundaria en la región del organizador nucleolar. Los cinco pares de cromosomas subacrocentricos muestran muy pocas diferencias. (Fig. 1).



Fig. 1 Metafase normal de Vicia faba , detenida con colchicina.

El promedio de duración del ciclo celular en la raíz principal de Vicia faba, es de 19.3 horas a 19°C (Evans y Scott, 1964) (Fig. 2)

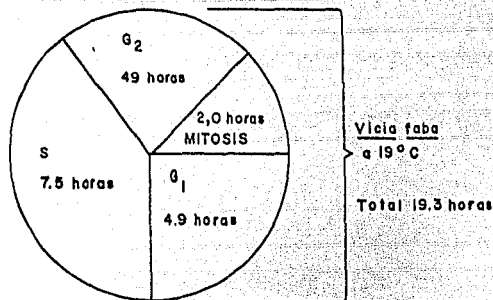


Fig. 2 Tiempo de generación celular en células meristemáticas de Vicia faba usando timidina tri-
tiada. Según Evans y Scott, 1964.

Según Kihlman (1966) cuando una sustancia induce aberraciones cromosómicas que empiezan a aparecer 3 horas después de iniciado el tratamiento y presenta su mayor frecuencia entre las 4 y las 10 horas, se considera que no produce retardo en la mitosis. Otras sustancias sí presentan este efecto, que se manifiesta cuando las aberraciones cromosómicas surgen después de 8 horas de haber sido aplicado el tratamiento y su mayor frecuencia se evidencia entre las 24 y las 48 horas.

Los períodos presintético (G₁) y postsintético (G₂) se efectúan en Vicia faba en casi 5 horas y la profase en menos de una hora. (Evans y Scott, 1964). Aparentemente los agentes que no producen retardo son capaces de inducir las aberraciones en las células que han completado su síntesis de DNA, mientras que las sustancias que provocan el retardo no lo hacen (Kihlman, 1966)

La posibilidad de usar el lapso entre el inicio del tratamiento y la aparición de las aberraciones en metafase como un indicador de la sensibilidad de los diversos estados de la interfase ha sido discutida sobre la base de que el retardo en la aparición de las aberraciones, puede ser el resultado del retardo mitótico producido por los agentes químicos (Evans, 1963)

Algunos agentes como como la hidrazina málica (HM) y el gas mostaza no producen efectos en la profase y en G_2 , porque los rompimientos cromosómicos se presentan tardíamente (Evans y Scott, 1964; Scott y Evans, 1964). Según Rieger y Michaelis (1964) los agentes químicos en general, provocan retardos y probablemente inducen la mayoría de las aberraciones durante la fase de síntesis.

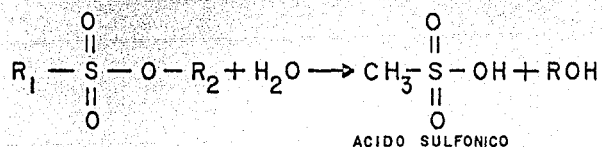
Se ha utilizado el alcohol etílico (AE) (Michaelis et al. 1959, 1962; Michaelis y Rieger, 1968), como agente inductor de aberraciones y se ha investigado su acción aislada y combinada con otros agentes. Tanto HM como AE inducen aberraciones de tipo retardado (Michaelis y Rieger, 1968). Los resultados obtenidos en los tratamientos combinados con dichos agentes, permiten considerar que la frecuencia de todos los tipos de aberraciones fueron solamente la suma de las frecuencias cuando se aplicaron por separado y que por lo tanto no se presentan efectos sinérgicos.

Cuando AE se usó diferentes concentraciones y tiempos, con una temperatura fija (24°C) y a varios tiempos de recuperación, se encontraron efectos diferentes en la etapa G₁ y S en las que se detectaron aberraciones cromosómicas, mientras que la frecuencia de alteraciones disminuyó en la etapa G₂ (Michaelis y Rieger, 1968)

La distribución de las aberraciones cromosómicas inducidas por HM y AE no se presentó al azar (Michaelis y Rieger, 1968), pues AE afectó más a los cromosomas pequeños y en especial a un segmento heterocromático del centro del brazo largo.

Las aberraciones producidas por HM y AE fueron rompimientos de isolocus, intercambios cromatídicos, duplicaciones-delecciones y deleciones intercalares (Rieger, 1968)

Se ha postulado (Heslot, 1970; Freese, 1971) que la reacción de hidrólisis de agentes alquilantes monofuncionales conduce a:



Se acepta generalmente (Konzak, et al. 1965) que los productos de hidrólisis (ácido sulfónico y el alcohol correspondiente) no tienen acción mutagénica sobre los organismos tratados, pero se les atribuye fuertes efectos tóxicos (Heslot, 1970). Con el objeto de conocer el daño que los alcoholes por sí mismos podrían realizar sobre los cromosomas y utilizando las aberraciones cromosómicas inducidas en la raíz prima-

ria de Vicia faba como criterio de daño, se compararon los efectos producidos por varias concentraciones y el mismo tiempo de exposición de los alcoholes (metílico, etílico, propílico y butílico).

MATERIAL Y METODOS

Se utilizaron habas (Vicia faba var. mayor) obtenidas del campo experimental de Santa Elena, Edo. de México de la cosecha 1970.

Las semillas se pusieron a germinar entre dos capas de algodón -- humedecido con agua corriente y previamente desinfectadas con hipoclorito de sodio (Sigma) al 1%.

Entre el 4^º y 5^º día apareció la radícula y se le quitó la testa a la semilla para evitar la infección de los hongos.

Al 6^º día las semillas fueron atravesadas a nivel de los cotiledones con un alambre delgado y colocadas en la boca de frascos de 100 ml. que contenían las diferentes sustancias probadas.

Se utilizó agua destilada para el testigo, y las soluciones probadas fueron alcoholes metílico (Baker); etílico (Reasol); propílico (Mallinckradt) y butílico (Harleco) que a continuación les serán dados los siguientes símbolos AM, AE, AP y AB respectivamente, a concentraciones de 2×10^{-1} M, 4×10^{-1} M y 6×10^{-1} M durante 4 horas cada una.

Transcurrido este lapso se colocaron nuevamente entre capas de algodón humedecido con agua corriente y se les dió un tiempo de recuperación de 24 horas.

Para la observación de cromosomas se utilizó la técnica de Villalobos-Pietrini (1965), con algunas modificaciones. Se cortaron 2 mm de

de la punta de la raíz principal y se colocó en un portaobjetos excavado e hidrolizó en HCl 1N a temperatura ambiente por 8 minutos; el HCl fué eliminado utilizando papel absorbente y en el mismo portaobjetos se agregaron varias gotas de una solución de aceto-orceina* durante 20 minutos. A continuación los cortes fueron trasladados a portaobjetos planos que contenían una gota de ácido acético al 45%. Rápidamente se colocó un cubreobjetos sobre la punta de la raíz, se aplicó papel absorbente y se hizo presión con la goma de un lápiz cuidando de no mover el cubreobjetos ("squash") - El material queda listo para ser observado al microscopio.

Para hacer las preparaciones permanentes se siguió la técnica de Conger y Fairchil (1953), colocándolas sobre hielo seco durante algunos minutos y separando los cubreobjetos con un bisturí; a continuación se deshidrataron con alcohol absoluto y xilol y se montaron en bálsamo de Canadá.

Se observaron para cada lote tratado entre 25 y 35 preparaciones de las cuales se seleccionaron células en anafase, hasta completar 100 para cada caso analizado. Hubo un testigo para cada uno de los lotes.

* Para la elaboración del colorante se utilizaron 3g deorceina sintética (Sigma) y 100 ml. de ácido acético (Merck) al 70%, se mezclaron estas sustancias y se calentaron hasta ebullición en un refrigerante durante 2 horas. Se dejaron enfriar y se filtraron.

RESULTADOS

Utilizando células en anafase, se observaron las aberraciones cromosómicas; obteniéndose (Tabla 2; Fig. 3) fragmentos anafásicos y (Tabla 5; Fig. 4) puentes anafásicos tanto para los alcoholes metílico, etílico y el propílico. En el caso del butílico no fué posible hacer preparaciones debido a que las raíces no resistieron el tratamiento. También se analizaron células en interfase para la observación de micronúcleos (Tabla 6; Fig. 5).

En la Tabla 1 se presenta el análisis del total de aberraciones de las tres concentraciones usadas para cada alcohol.

La frecuencia de fragmentos anafásicos producidos por los alcoholes metílico, etílico y propílico (Tabla 2) fueron tratados estadísticamente por un análisis de la varianza, pero dado que ésta prueba tiene restricciones (tales como normalización y homogeneidad de los datos) fué necesario hacer el ajuste a los datos para poder aplicarla.

Para normalizar los datos se usó la corrección de $\sqrt{n+1}$ y los valores se muestran en la Tabla 3. Estos valores se graficaron en papel -probit por medio de los datos porcentuales agrupados (gráfica 1), la línea recta obtenida muestra que los datos son normales.

Para comprobar la homogeneidad de datos se aplicó la prueba de Cochran obteniéndose que la C experimental es menor que la C de tablas a un α de 0.05 por lo que se acepta que si hay homogeneidad en las varianzas. (Apéndice I).

Una vez cumplidas estas restricciones se llevó a cabo el análisis - de la varianza (Tabla 4).

El resultado experimental obtenido para renglones a un α de 0.05 - no muestra diferencias significativas; en cambio para columnas al mismo nivel de confianza sí las presentó.

Para comprobar la efectividad en cuanto a la producción de aberraciones de los diferentes alcoholes probados se hizo el contraste de medias utilizando la F de Snedecor (Apéndice II) en los datos consignados en la Tabla 3, encontrándose que para los alcoholes metílico y propílico no hubo - significatividad en los datos a un α de 0.05, pero para alcohol etílico se - presentó una gran significatividad al mismo nivel de confianza.

La frecuencia de puentes anafásicos producidos por AM, AE y AP- se muestra en la Tabla 5 en tanto que la frecuencia de micronúcleos está en la Tabla 6, al no observar significatividad en los datos de estas tablas no se aplicó ninguna prueba estadística, concluyéndose de lo anterior que no hubo variación entre los diferentes alcoholes probados y las concentraciones utilizadas.

Tabla 1 Frecuencia y distribución de aberraciones cromosómicas inducidas por los alcoholes metílico (AM) etílico (AE) y propílico (AP) en raíz de Vicia faba.

Alcohol	Fragmentos Anafásicos	Puentes anafásicos	Total de células analizadas	% de células anormales	% de micronúcleos	Total de células analizadas para micronúcleos
Metílico	66	7	300	24.3	4.4	3000
Etílico	146	16	300	54.0	7.2	3000
Propílico	72	9	300	27.0	4.4	3000
Testigo	0	0	300	0	0	3000

Tabla 2 Frecuencia de fragmentos anafásicos producidos por AM, AE y AP.

Alcohol Conc.	AM	AE	AP
$2 \times 10^{-1} M$	24/100	57/100	26/100
$4 \times 10^{-1} M$	21/100	41/100	22/100
$6 \times 10^{-1} M$	21/100	48/100	24/100

Tabla 3 Valores con la corrección $\sqrt{n+1}$ (Para normalizar los datos)

	A	B	C	
a	5.00	7.60	5.20	17.80
b	4.69	6.49	4.79	15.97
c	4.69	7.00	5.00	16.69
Ti+	14.38	21.09	14.99	50.46
\bar{X}	4.79	7.03	4.99	

Se aplica la siguiente fórmula a los valores de la tabla 3.

$$\frac{\sum T_i^2}{r} - \frac{\sum T_i^2}{rc} = S_c.$$

Tabla 4 Análisis de la varianza

	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Media de cuadrados
Renglones	0.4932	2	0.2466
Columnas	9.1784	2	4.5892
Residual	0.2584	4	0.0643
Total	9.9300	8	

$$F_R = 3.83$$

$$F_C = 71.37$$

$$F_{0.95}(2, 4) = 6.94$$

REGLONES

COLUMNAS

$$H_0 = \mu_a = \mu_b = \mu_c$$

$$\text{Dado que: } \sigma_a^2 = \sigma_b^2 = \sigma_c^2$$

$$F_{R_{exp}} < F_{0.95}$$

∴ No hay significatividad

$$\alpha = 0.05$$

$$H_0 = \mu_A = \mu_B = \mu_C$$

$$\text{Dado que: } \sigma_A^2 = \sigma_B^2 = \sigma_C^2$$

$$F_{C_{exp}} > F_{0.95}$$

∴ Si hay significatividad

$$\alpha = 0.05$$

Tabla 5 Frecuencia de puentes anafásicos producidos por AM, AE, y AP.

Alcohol Conc.	AM	AE	AP
$2 \times 10^{-1} M$	3/100	4/100	3/100
$4 \times 10^{-1} M$	3/100	9/100	6/100
$6 \times 10^{-1} M$	1/100	3/100	0/100

Tabla 6 Frecuencia de micronúcleos producidos por AM, AE y AP.

Alcohol Conc.	AM	AE	AP
$2 \times 10^{-1} M$	48/1000	87/1000	62/1000
$4 \times 10^{-1} M$	42/1000	63/1000	63/1000
$6 \times 10^{-1} M$	43/1000	68/1000	61/1000

99.9 99.9 99.3 99 98 95 90 80 70 60 50 40 30 20 10 5 2 1 0.5 0.2 0.1 0.05 0.01

GRAFICA 1

NORMALIZACION DE DATOS

No. DE OBSERVACIONES

50

40

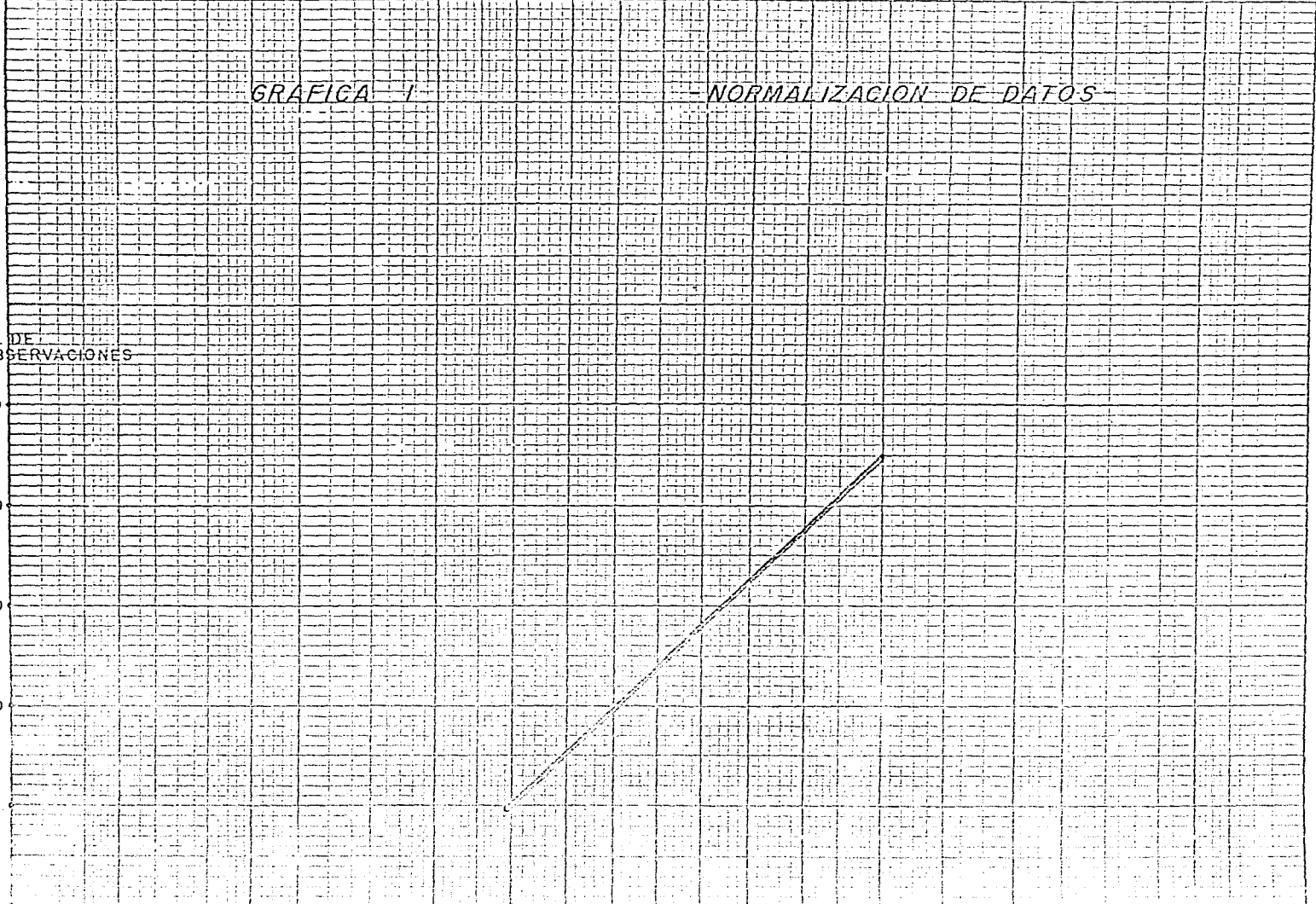
30

20

10

0.01 0.05 0.1 0.2 0.5 1 2 5 10 20 30 40 50 60 70 80 90 95 99.3 99.9

- % DE DATOS ACUMULADOS -



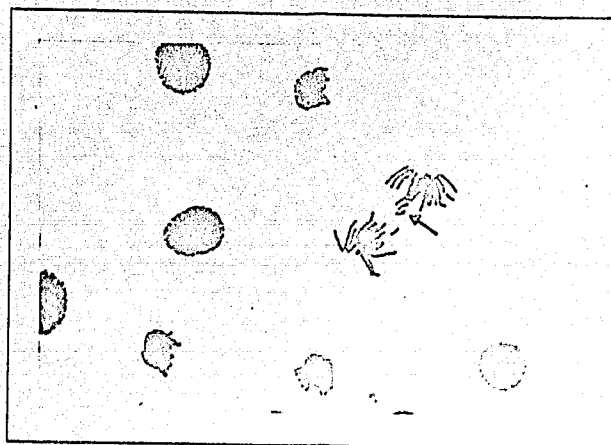


Fig. 3 Célula en anafase mostrando fragmentos inducidos por alcohol etílico 2×10^{-1} M



Fig. 4 Célula en anafase mostrando puentes inducidos por alcohol propílico 4×10^{-1} M

Fig.

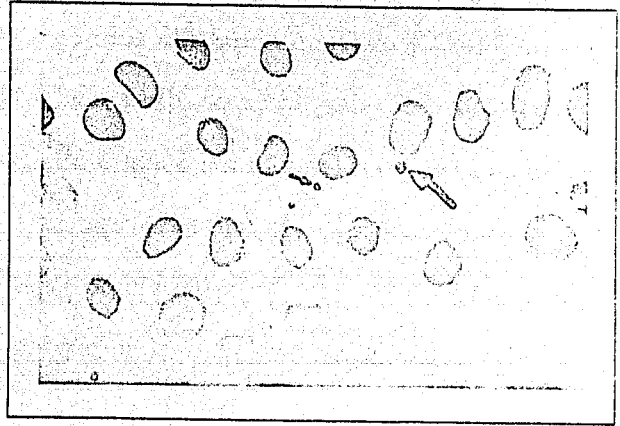


Fig. 5 Células meristemáticas
en interfase con micronúcleos
inducidos por alcohol metílico
 6×10^{-1} M.

DISCUSION Y CONCLUSIONES

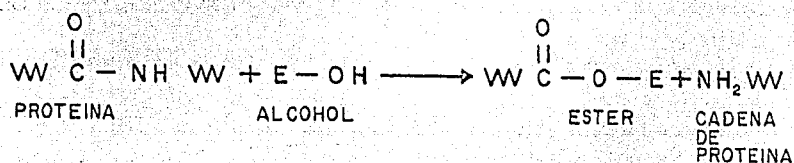
En la frecuencia de fragmentos anafásicos se observa que los datos son significativos por columnas y no por renglones (Tabla 4) de donde se deduce que lo que está influyendo son las diferentes clases de alcoholes y no las concentraciones de los mismos; en los datos por columnas se observa de acuerdo al análisis estadístico que en donde hay diferencias es en el alcohol atílico, ésto se debe probablemente a las propiedades físicas y químicas de cada alcohol, puesto que los alcoholes metílico y propílico endurecieron mucho las raíces y debido a ello no se obtuvieron preparaciones tan buenas como en el etílico. En el caso del alcohol butílico el daño a las raíces fué tan grande que éstas murieron durante el tratamiento, quizá debido al gran poder deshidratante de este alcohol, por tal motivo no fué posible hacer preparaciones porque incluso en la concentración más baja se presentó el citado problema.

Para la frecuencia de puentes anafásicos y micronúcleos no se observaron datos significativos de lo que se deduce que estos tipos de aberraciones son independientes tanto de los alcoholes como de las diferentes concentraciones. Probablemente para encontrar significatividad podrían variarse las concentraciones de los alcoholes y poder establecer así la concentración óptima que sin dañar mucho el tejido pueda aumentar la frecuencia de aberraciones.

Se han reportado los tipos de aberraciones producidas por alcohol etílico en el meristemo de la raíz primaria de Vicia faba (Michaelis,

Nicoloff y Rieger, 1962 y Rieger y Michaelis, 1964, 1968) pero ninguno de estos autores explican los posibles mecanismos de reacción del alcohol citado sobre el DNA y las proteínas.

Tomando en cuenta el mecanismo de reacción propuesto por Morrison (1973), sobre proteínas, el alcohol produce el rompimiento de la cadena peptídica, a esto se le conoce como alcoholisis de sustitución de aminas (sustitución acil nucleofílica)



Otra vía posible es la acción de los alcoholes sobre la membrana de lisosomas, en la que éstos actuarían sobre las proteínas de los mencionados organelos y ocasionarían una liberación de enzimas, como proteasas RNasas, DNasas, etc.

Al encontrar (Allison, 1965) que la DNasa liberada de lisosomas -- puede fragmentar cromosomas de esperma de erizo y producir cambios visibles en parte de los cromosomas politénicos de células de Drosophila, el mencionado autor sugiere como la más probable interpretación que la citada enzima liberada de los lisosomas puede romper el DNA. Al probar otras enzimas incluyendo proteasas y RNasa no encontró rompimientos cromosómicos.

Evans y Scott (1964) en experimentos con Vicia faba, utilizando hi

drazina mállica, concluyen que probablemente el rompimiento de las cadenas de DNA en una cromatida ocurren durante el período de síntesis, momento en el que el DNA se ha extendido para su replicación y es particularmente vulnerable al ataque enzimático, y las enzimas lisosómicas pueden romper tanto la cadena madre como la sintetizada de novo al mismo tiempo.

Al encontrar que los diferentes alcoholes probados inducen aberraciones de los tipos señalados en la Tabla (1) puede pensarse que la acción mutagénica de los agentes alquilantes monofuncionales no se deba solamente a la alquilación de la cadena de DNA, y que los alcoholes producidos durante la hidrólisis de los agentes alquilantes tomen una parte activa en la inducción de rompimientos. Sin embargo son necesarios estudios más precisos que establezcan la concentración a la cual los alcoholes se presentan en la reacción de hidrólisis de los agentes alquilantes.

APENDICE (I)

PRUEBA DE COCHRAN

$$C = \frac{Si^2 \text{ mayor}}{\leq Si^2}$$

$$C \text{ exp} = 0.5220531$$

$$C_{0.95} (2.3) = 0.8704$$

$$H_0 = \sigma^2 A = \sigma^2 B = \sigma^2 C.$$

$$\text{Dado que } C \text{ exp} < C_{0.95}$$

∴ Se acepta la hipótesis y hay homogeneidad en las varianzas.

APENDICE (II)

CONTRASTE DE MEDIAS F DE SNEDECOR

$$F = \frac{(\bar{X}_1 - \bar{X}_2)^2}{S^2_d (N_1 + N_2) / N_1 N_2}$$

Entre los alcoholes metílico y propílico:

$$F_{\text{exp}} = 0.93327$$

$$F_{0.95} (2.4) = 6.94$$

$$F_{0.95} = 13.88$$

$$F_{\text{exp}} < F_{0.95}$$

∴ No hay significatividad

Entre los alcoholes metílico y etílico:

$$F_{\text{exp}} = 117.06952$$

$$F_{0.95} = 13.88$$

$$F_{\text{exp}} > F_{0.95}$$

∴ Si hay significatividad.

REFERENCIAS

- Ahmed, M. y Grant, W.F. 1972. Cytological effects of the pesticides phosdrin and bladex on Tradescantia and Vicia faba. Can. J. Genet. 14:157-165.
- Allison, C.A. y Paton, R.G. 1965. Chromosome damage in human diploid cells following activation of lysosomal enzymes. Nature. Vol. 207:1170-1173.
- Auerbach, C. 1950. Differences between effects of chemicals and physical mutagens. Publ. staz. zool. Napoli (ssuppl): 1-23
- Bacq, Z.M. y Alexander, P. 1955. Fundamentals of radiobiology. Academic Press, N. Y. pp 389.
- Catcheside, D.C. 1948. Genetic effects of radiation. Adv. Genet. 2:271-358.
- Cohn, N.S. 1964. Similar cytological effects of hidroxilamine and 5-FUDR, agents with different modes of action. Separatum Experientia 20, 158. pp 1-12.
- Conger, A.D. y Fairch, L.M. 1953. A quick freeze method for making smear slides permanent. Stain Technol. 28:281-283.
- Darlington, C.D. y La Cuor, L.F. 1960. The handling of chromosomes. George Allen & Unwin Ltd. London, pp 90-96.

Dixon, J.W. y Massey, J.F. 1966. Introduction to statistical analysis. 3a. ed. Mc Graw-Hill. New York, pp 167-187.

Dobzhansky, T. 1931. The decrease in crossin-over observed in translocations and its probable explanation. Amer. Nat. 65:214-232.

Downie, M.N. y Heat, W.R. 1971. Métodos estadísticos aplicados. Harper & Row publishers, Inc. New York, pp 238-224.

Evans, H.J. Neary, G.H. y Tonkinson, S.M. 1957. The use of colchicine as an indicator of mitotic rate in broad bean root meristems. J. Genet. 55:487-502.

Evans, H.J. 1963. Chromosome aberrations and target theory. In: Radiation induced chromosome aberrations (S. Wolff, ed) Columbia Press. New York, pp 8-40

Evans, H.J. y Scott, D. 1964. Influence of DNA synthesis on the production of chromatid aberrations by X-rays and maleic hydrazine in Vicia faba. Genetics: 17-38

Freese, E. 1971. Molecular mechanism of mutation. En Chemical Mutagens. Vol. 1 Hollander A. ed. New York, pp 34-35

Fryer, H.C. 1966. Concepts and methods of experimental statistics. Allyn and Bacon, Inc. Boston, pp 248-258.

Heslot, H. 1970. Chemical mutagens. En Manual on Mutation Breeding. International Atomic Energy Agency, Vienna, pp 54-55

Hollander, A. 1971. Chemical mutagens principles and methods for their detection. Vol. 1. Plenum Press. New York, pp 46-48.

Kihlman, B.A. y Eriksson, T. 1962. The distribution between cell nuclei of isolocus breaks and chromatid interchanges induced by radiomimetic - chemicals in Vicia faba. Hereditas: 48: 520-529.

Kihlman, B.A. 1966. Actions of chemicals on dividing cells. Prentice Hall. New Jersey, pp. 117-142.

Kihlman, B.A. y Odmark, G. 1966. Effects of adenine nucleosides on --- chromosomes, cell division and nucleid acid synthesis in Vicia faba. He reditas 56: 71-82.

Kihlman, B.A. 1968. The effect of oxygen nitric oxide, and respiratory -- inhibitors on the production of chromosome aberration by X-rays. Exp. - Cell. Res. 14: 639-641.

Konzak, C.F., Nilan, R.A., Wagner, J. y Foster, R.J. 1965. Efficient chemical mutagenesis, the use of induced mutations in plants breeding. - En. (Rep. FAD/IAEA Tech. Meeting, Rome, 1964), Pergamon Press, pp - 49-70.

La Cour, L.F. 1941. Acetic-orcein: A new stain-fixative for chromosomes. Stain Technol. 16: 169-174.

Margery, W. y Shaw, M.D. 1970. Human chromosome damage by chemical agents. Annual review of Medicine. Vol. 21: 409-432.

Michaelis, A., Nicoloff, H. y Rieger, R. 1962. Influences of the EDTA on the induction of chromatid aberrations by triethylenemelamine and ethyl -- alcohol. Biochem. Biophys. Res. Commun. 9: 280-284.

Michaelis, A. Ramshorn, K. y Rieger, R. 1959. Athylalkol-radiomimetisches agens bei Vicia faba. Naturwis 46: 381-382.

Michaelis, A. y Rieger, R. 1968. On the distribution between chromosomes of chemically induced chromatid aberrations: studies with a new kariotype of Vicia faba. Mutations Res. 6: 81-92.

Morrison, T.R. y Boyd, N.R. 1973. Organic Chemistry. 3a. ed. Allyn and -- Bacon, Inc. Boston, pp 1164-1179.

Oehlkers, F. 1953. Chromosome breaks influenced by chemicals. Heredity 6 (Suppl.): 95-106.

Revell, S.H. 1953. Chromosome breakage by X-rays and radiomimetic --- substances in Vicia faba. Symposium on chromosome breakage. Hereditas 6 (Suppl.): 107-124.

Revell, S.H. 1958. A new hypothesis of chromatid aberrations and its re--- levance to theories for the mode of action of chemicals agents. An. N.Y. - Acad. Sci. 68: 802-807.

Rieger, R. y Michaelis, A. 1964. On the distribution amongst cells of ---
chemically induced chromatid aberrations in Vicia faba root tip meris-
tems. Mutation res. 1: 109-112.

Scott, D. y Evans, H.J. 1964. On the non-requirement for DNA synthesis
in the production of chromosome aberrations by 8-ethoxy caffeine. --
Mutation Res. 1: 146-156.

Swanson, P.C. 1965. Cytology and Cytogenetics. Prentice-Hall, Englewood
Cliffs, N.J., pp 349-391.

Takehisa, S. 1972. Two types of negative heterochromatin in Vicia faba
as related to non-random distribution of chemically induced chromosome --
aberrations. Mutation Res. 17: 267-269.

Villalobos-Pietrini, R. 1965. Alteraciones inducidas por los rayos X en los
cromosomas de las células meristemáticas de la raíz de Vicia faba. I as
pectos técnicos. Bol. Soc. Bot. Mex. 29: 178-183.

Villalobos-Pietrini, R., Palomino, G. y Breña, M. 1967. Alteraciones in-
ducidas por los rayos X en los cromosomas de las células meristemáti-
cas de la raíz de Vicia faba. III influencia de la temperatura en la fre-
cuencia de las aberraciones cromosómicas. An. Inst. Biol. Univ. Nal. --
Auton. México 38, Ser. Biol. Exp. (1): 11-23.