

# EFFECTO DE PLOMO SOBRE EL CRECIMIENTO RADICAL DE CEBOLLA (*Allium cepa* L.)<sup>1</sup>

## Effect of lead on onion (*Allium cepa* L.) root growth.

Laura Ochoa M.<sup>2</sup>, Cecilia Leyton M.<sup>3</sup>, Jorge Sans P.<sup>3</sup> e Inés Pepper B.<sup>4</sup>

### SUMMARY

The effect of lead on *Allium cepa* L. root growth was studied. This work includes an analysis of its effects on root longitudinal growth, on mitotic activity in the meristematic zone, on cellular elongation in the mature zone and on oxygen consumption in the root tip.

Lead inhibits root growth in relation to dose in all studied concentrations including the maximal permitted concentration established by the National Normalization Institute of Chile (5 mg/L). Root growth inhibition would be principally due to an alteration on cell elongation as a consequence of impaired cellular respiration.

**Key words:** *Allium cepa* L., onion, heavy metals, proliferation, root.

### INTRODUCCION

Los metales pesados, en su calidad de contaminantes ambientales, tienen como característica en común el producir toxicidad cuando sus concentraciones en organismos vivos sobrepasan ciertos niveles críticos. El plomo, al igual que otros metales pesados, no es biodegradable, acumulándose en los organismos vivos aun cuando su incorporación sucesiva sea en cantidades pequeñas. Por éstas y otras razones, se ha establecido límites de ingestión admisibles o tolerables que no deben ser sobrepasados (Chiang, 1987). Con igual finalidad, se ha determinado concentraciones máximas permisibles en alimentos y en aguas de bebida y de riego (Reglamento Sanitario de Alimentos, Chile, 1982).

La presencia de plomo como contaminante ambiental está íntimamente ligada a las grandes ciudades, ya que es un elemento que surge de la combustión de derivados del petróleo en vehículos de

transporte (Datta y Ghosh, 1985; Rodríguez-Castellón, 1980) y sistemas de calefacción. Además está relacionado con fábricas de baterías (Cooper, Wong y Kheifets, 1985; Morales y Becker, 1986), plantas procesadoras de óxidos de sulfuro y molibdeno (Morales y Becker, 1986), fundiciones de minerales (González, Bergqvist e Ite, 1984) etc., pudiendo ser incorporado a través de las cadenas tróficas a plantas, animales y hombre (Chaney, 1985; Hernández, y otros, 1987; Shariatpanahi y Anderson, 1986).

La incorporación de plomo en cantidades excesivas a los vegetales produce alteraciones en procesos enzimáticos y hormonales, afectando especialmente la respiración a nivel mitocondrial (Hasan, Vihko y Hernberg, 1967; Mengel y Kirkby, 1978). En el hombre, los efectos más relevantes son aquellos que afectan a glóbulos rojos por interferencia con la síntesis del grupo prostético Hem (Louria, Joselow y Browder, 1972).

La definición de métodos biológicos y la evaluación de daño por toxicidad de los contaminantes, ha sido considerada como un avance necesario para orientar a las autoridades en el establecimiento de normas acerca de los niveles máximos permitidos para cada uno de ellos (INIA, 1987). Con este propósito, se ha utilizado las raíces de bulbos de cebolla como modelo experimental para estudiar el efecto biológico de contaminantes (Pepper, Galanti y Sans, 1987, 1988a, 1988b y 1988c).

El cultivo de bulbos de *Allium cepa* L., en agua potable, induce la brotación de 20 a 50 raíces adventicias isogénicas. Bajo condiciones reguladas

<sup>1</sup>Recepción de originales: 12 de diciembre 1991.

Este trabajo ha sido parcialmente financiado por el proyecto FONDECYT 82-812.

Los autores agradecen la valiosa colaboración del Dr. Jorge Ferreira en los experimentos de medición de consumo de oxígeno y de la Profesora Mónica Acuña P., por su asesoría en el análisis estadístico de los resultados.

<sup>2</sup>Instituto de Medicina Experimental, Hospital José Joaquín Aguirre, Facultad de Medicina, Universidad de Chile, Casilla 70058, Correo 7, Santiago, Chile.

<sup>3</sup>Departamento de Biología Celular y Genética, Facultad de Medicina, División Norte, Universidad de Chile, Casilla 70061, Correo 7, Santiago, Chile.

<sup>4</sup>Departamento de Medicina Experimental, Facultad de Medicina, División Norte, Universidad de Chile, Casilla 70058, Correo 7, Santiago, Chile.

de aireación y temperatura, las raíces crecen en equilibrio dinámico (Calvo y otros, 1982), manteniéndose constantes en el tiempo procesos tales como número de células en división, duración del ciclo celular y cada uno de sus períodos, frecuencia de células en los distintos compartimentos del ciclo celular, número de células que se diferencian, etc. Además, la alta permeabilidad de la raíz permite un intercambio activo y permanente con elementos presentes en el medio de incubación. Las características de las células radicales permiten efectuar una estimación cualitativa y cuantitativa del efecto de diversas sustancias sobre los parámetros propios del ciclo celular y del proceso de diferenciación celular.

En este trabajo se investiga el efecto de plomo sobre el crecimiento de raíces de bulbos de cebolla (*Allium cepa* L.) y los parámetros que lo sustentan, es decir, proliferación y elongación celular. Además, se estudia el efecto de este metal pesado sobre el consumo de oxígeno de las raíces.

## MATERIALES Y METODOS

**Material.** Se utilizó raíces adventicias de bulbos de cebolla *Allium cepa* L., variedad Perla, de un peso promedio de 20 gramos. Las cebollas fueron cosechadas durante los meses de febrero y marzo y fueron adquiridas en la Vega Central de Santiago. Se mantuvieron en cajas de cartón, distribuidas en monocapas. Permanecieron a temperatura ambiente y en la oscuridad hasta el momento de ser utilizadas en los experimentos.

**Cultivo.** Las raíces se obtuvieron sumergiendo la base del bulbo en agua potable filtrada contenida en tubos de 80 ml a los cuales se adaptó un sistema de aireación continua de 10 a 20 ml, por minuto. El sistema de cultivo se mantuvo en un incubador termorregulado (Precision Corp. USA) a una temperatura constante de  $15 \pm 0,5$  °C y en oscuridad. El pH del agua se ajustó con ácido nítrico 1 N hasta alcanzar un valor de 6,5.

**Tratamientos.** Se utilizó soluciones de nitrato de plomo preparadas en agua potable filtrada a pH 6,5, en un rango de concentraciones que incluyó la concentración máxima permitida por el Instituto Nacional de Normalización de Chile (5,0 mg/L de plomo). Las concentraciones utilizadas fueron: 2,5; 5,0; 7,5; 10,0 y 12,5 mg/L del elemento Pb. Los bulbos enraizados, se incubaron en estas soluciones después de 48 hr de cultivo en agua, momento en el cual ellas han alcanzado una cinética de crecimiento en equilibrio dinámico. Las soluciones de plomo se renovaron cada 24 hr y plantas enraizadas de control se mantuvieron en agua

potable filtrada por un tiempo equivalente a los tratamientos con el elemento. Se obtuvo muestras de raíces en los tiempos indicados para cada experimento en particular.

**Crecimiento radical.** Se determinó midiendo la longitud de 10 a 12 raíces por bulbo (previamente individualizadas), cada 48 hr durante 144 horas.

**Actividad proliferativa en la zona meristemática.** Se cuantificó determinando la frecuencia de células en mitosis en el ápice de raíces obtenidas después de 48, 96 y 144 hr de iniciado el tratamiento. Las raíces se fijaron en etanol-ácido acético 3:1 volumen/volumen durante 24 hr a 4 °C, y luego de ser teñidas con orceína acética clorhídrica (Tjio y Levan, 1950) se realizó preparados histológicos aplastando la región meristemática en el portaobjeto con el fin de obtener la disgregación de las células en monocapa. Se determinó la frecuencia de células en mitosis en mil células por aplastado (Índice Mitótico o I.M.). Para cada punto experimental y control, se cuantificó un promedio de 10 raíces.

**Longitud celular en la zona madura de la raíz.** La longitud de las células epidérmicas en la zona madura de la raíz (10 a 20 milímetros desde el ápice radical) se midió *in vivo* en un microscopio óptico marca Olympus utilizando un objetivo de 40x y un ocular micrométrico, marca Olympus, de 10x. La longitud celular se midió después de 96 hr de iniciados los tratamientos continuos, con las diferentes concentraciones de plomo antes señaladas. Se midieron de 100 a 150 células por raíz, en 3 a 4 raíces por tratamiento.

**Consumo de oxígeno de la raíz.** El consumo de oxígeno de raíces controles y experimentales, se midió polarográficamente con un electrodo de oxígeno tipo Clark Nº 5331 (Yellow Springs Instruments Co.), colocado horizontalmente en una celda de vidrio de 1,8 ml de volumen y termorregulado a 25 °C. Se valoró el consumo de oxígeno en segmentos de raíces de 1 cm de longitud (ápice), obtenidos después de 96 hr de tratamientos continuos con las distintas concentraciones de plomo y también en raíces tratadas en forma continua con plomo durante 48 hr, seguida de una posterior incubación en agua potable filtrada durante otras 48 horas. La velocidad de consumo de oxígeno, en nanomoles de oxígeno por minuto, por gramo de tejido, se expresó en los resultados como porcentaje de consumo de oxígeno en relación al control.

**Procedimientos estadísticos.** La significancia de los resultados de actividad proliferativa (I.M.) se determinó por el método no paramétrico de Wilcoxon (Sokal y Rohlf, 1969). En el análisis de

los resultados de crecimiento radical se utilizó la prueba T de Student.

## RESULTADOS Y DISCUSION

Los resultados del efecto de plomo sobre el crecimiento radical muestran una visión global de la acción del elemento sobre el modelo biológico utilizado. En la Figura 1 se observa una disminución progresiva en la velocidad de crecimiento radical la cual es dependiente tanto de la concentración de plomo como del tiempo. Estos mismos resultados, expresados en la Figura 2 como tasa de crecimiento (diferencia entre longitud final e inicial de la raíz en el tiempo total de tratamiento), permiten observar con mayor claridad el efecto inhibitorio de plomo sobre el crecimiento de la raíz. Es importante señalar que la concentración máxima permitida por el Instituto Nacional de Normalización (INN, 1978),

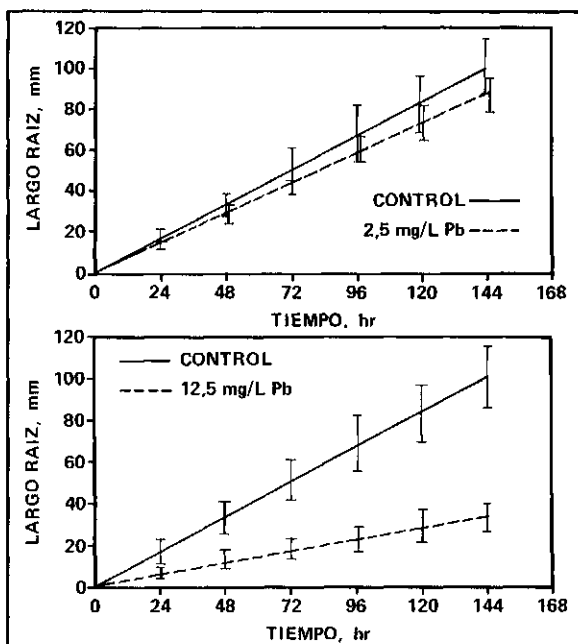


FIGURA 1. Efecto de distintas concentraciones de plomo sobre el crecimiento longitudinal de la raíz.

FIGURE 1. Effect of different lead concentrations on root longitudinal growth.

para aguas de distintos usos (5 mg/L), ejerce un efecto inhibitorio significativo sobre el crecimiento radical ya a las 96 hr, correspondiendo su longitud a un 56,7% de los controles.

Estos resultados concuerdan con lo señalado por Barceló y Pocherrieder (1989), quienes han afirmado que las raíces de cebollas responden ante

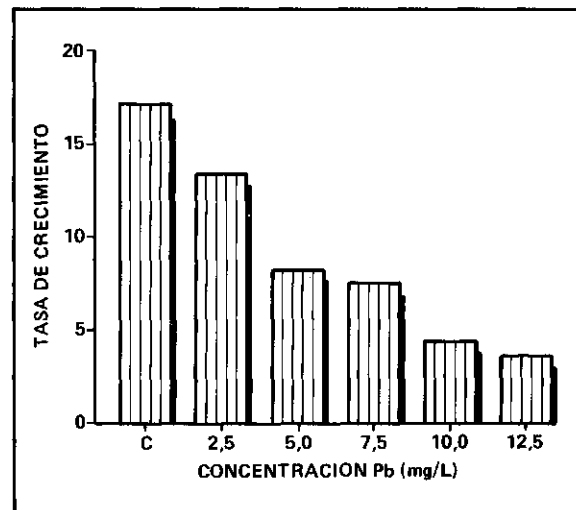


FIGURA 2. Tasa de crecimiento radical en bulbos control y tratados con diferentes concentraciones de plomo.

FIGURE 2. Root growth rate in control and lead treated onion bulbs.

la presencia de metales pesados con una significativa reducción de su crecimiento. Asimismo, se ha descrito reducción del crecimiento radical de *Allium cepa* L., en presencia de diversas concentraciones de arsénico y cobre (Pepper, Galanti y Sans, 1988a y 1988b). Los resultados de este trabajo, y los de aquellos previamente citados, apuntan a que los distintos metales pesados ejercerían un efecto fitotóxico cuando superan cierta concentración crítica, la cual es distinta para cada uno de ellos. Este hecho, permite enfatizar en la necesidad de determinar la concentración que presenta fitotoxicidad inicial para cada elemento en particular.

El efecto inhibitorio de plomo sobre el crecimiento radical puede ser producto de una alteración de la división celular en la zona meristemática y/o una alteración del proceso de elongación celular en la zona de maduración de la raíz.

La frecuencia de células en mitosis en raíces de plantas sumergidas en soluciones con la totalidad de las concentraciones probadas, no presenta cambios significativos, manteniéndose los valores encontrados en el rango de los controles ( $13,2\% \pm 0,9$ ). Este hecho, puede significar que el plomo no afecta al ciclo celular, o bien, que cada una de sus etapas transcurre con mayor lentitud. Considerando que el plomo afecta el metabolismo oxidativo celular y que el ciclo celular es dependiente de energía, lo más probable es que el ciclo proliferativo de las células meristemáticas sea más lento en las raíces tratadas con este metal pesado.

El comportamiento proliferativo de las células meristemáticas, en raíces tratadas con plomo difiere de aquel encontrado para arsénico y cobre (Pepper, Galanti y Sans, 1987, 1988a y 1988b), en los cuales sí se producen cambios significativos. Esto confirma lo establecido por Barceló y Poschenrieder (1989), quienes consideran que cada elemento tóxico opera de manera distinta y peculiar sobre los vegetales.

Los resultados del estudio del efecto de plomo sobre el otro parámetro del crecimiento radical, la elongación celular, se muestran en la Figura 3. En ella, las células epidérmicas de la zona madura de la raíz, están agrupadas en intervalos de menor a mayor longitud. Se puede observar una mayor frecuencia de células ubicadas en los rangos de menor longitud, en las raíces tratadas que en las control. Así, alrededor de un 90% de las células de las raíces tratadas con plomo, presentan un tamaño menor que las control. La longitud promedio de las células epidérmicas, es menor en las raíces tratadas con las tres concentraciones de plomo analizadas (Cuadro 1). En este cuadro, se relaciona la longitud radical con la longitud celular promedio e índice mitótico, después de 96 horas de tratamiento con plomo. Estas tres mediciones se realizaron simultáneamente en las mismas raíces. Se aprecia que tanto los valores de longitud radical como los de longitud celular disminuyen en forma directamente proporcional a la concentración de plomo, manteniéndose la frecuencia de células en mitosis en el rango control. Estos resultados permiten atribuir a un alteración en la elongación celular la responsabilidad principal en la inhibición del crecimiento radical inducido por plomo.

La inhibición de la elongación celular podría deberse a un efecto nocivo del plomo sobre algún aspecto importante del metabolismo de estas células. Con el fin de estudiar si el plomo afecta el metabolismo oxidativo en este sistema, se midió el consumo de oxígeno después de 96 hr de tratamiento continuo con diversas concentraciones de este metal. En efecto, los resultados obtenidos (Cuadro 2) muestran que el consumo de oxígeno disminuye después de una incubación de 96 hr, en tres concentraciones crecientes de plomo. Esta disminución es de una magnitud similar en las tres concentraciones estudiadas.

Para analizar una posible reversibilidad de los efectos de plomo observados, las raíces se trataron durante 48 hr con el metal pesado, incubándolas posteriormente en agua por otras 48 hr. El consumo de oxígeno se midió al término de estos dos intervalos (Cuadro 2). Se observa que el consumo de oxígeno, que disminuye levemente después de

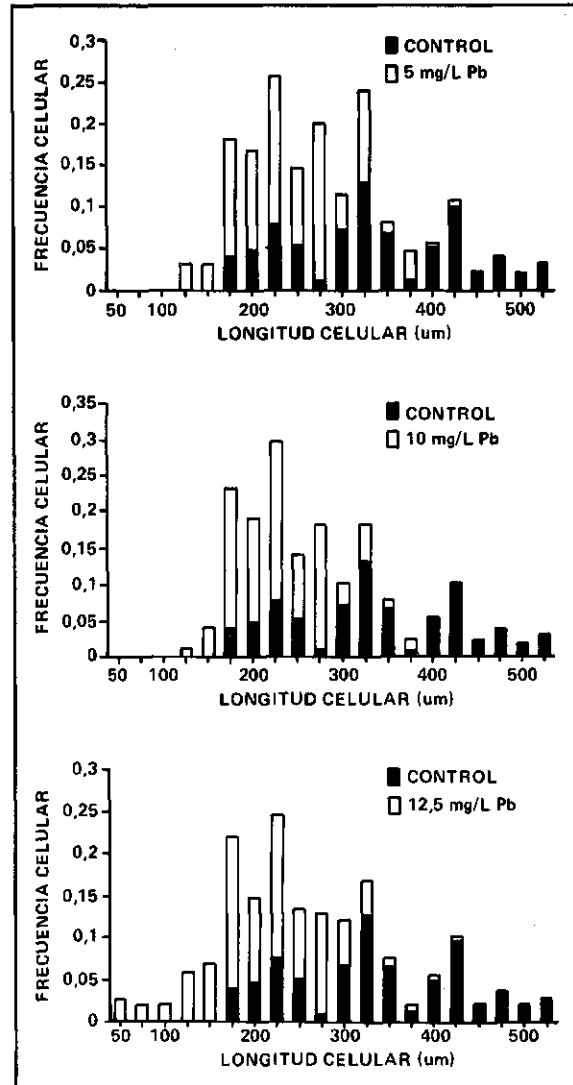


FIGURA 3. Efecto de plomo sobre la longitud celular en la zona madura de raíces tratadas con diversas concentraciones del elemento.

FIGURE 3. Effect of lead on cellular length in the mature zone of roots treated with different concentrations of the element.

48 hr de incubación con Pb, recupera niveles un poco superiores a los controles después de la incubación en agua. Al medir en las mismas raíces la longitud radical a las 48 y 96 hr se observa que con todas las concentraciones analizadas la cinética de crecimiento radical se recupera una vez suspendido el tratamiento con plomo (Figura 4). Estos resultados sugieren que el efecto de plomo sobre el crecimiento radical durante 48 hr, produce cambios reversibles.

Antecedentes de la literatura, sugieren que las células afectadas por plomo pueden presentar una gran variedad de alteraciones metabólicas. El plomo

**CUADRO 1. Efecto de plomo sobre longitud radical, longitud celular en la zona madura e índice mitótico en la zona meristemática de la raíz**

**TABLE 1. Effect of lead on radicular length, on cellular length in the mature zone and on mitotic index in the meristematic zone of the root tip**

Tratamiento	Longitud radical (mm)	Longitud celular ( $\mu\text{m}$ )	Índice mitótico (%)
Control	71,5 $\pm$ 13,1 <sup>1</sup>	335,5 $\pm$ 142,4	13,2 $\pm$ 0,9
5,0 mg/L	33,0 $\pm$ 9,5	236,6 $\pm$ 64,7	15,5 $\pm$ 1,7
10,0 mg/L	20,5 $\pm$ 7,9	221,5 $\pm$ 55,1	11,1 $\pm$ 2,2
12,5 mg/L	16,9 $\pm$ 3,8	206,4 $\pm$ 70,0	11,8 $\pm$ 3,5

<sup>1</sup>Promedio  $\pm$  desviación estándar.

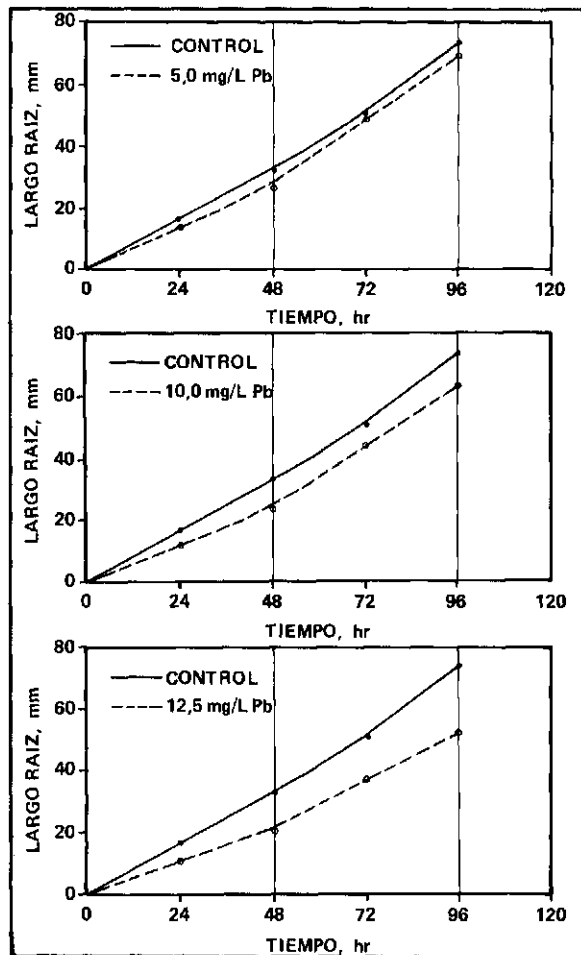


FIGURA 4. Crecimiento radical en bulbos de cebolla tratados por 48 hr con diferentes concentraciones de plomo e incubados posteriormente por 48 hr en agua potable.

FIGURE 4. Root growth in onion bulbs treated for 48 hr in different lead concentrations and incubated after-wards for 48 hr in tap water.

**CUADRO 2. Efecto de plomo sobre el consumo de oxígeno en el ápice radical (%)**

**TABLE 2. Effect of lead on oxygen consumption in the root apex (%)**

Tratamiento	48 hr Pb	96 hr Pb	48 hr Pb + 48 hr H <sub>2</sub> O
Control	100,0	100,0	100,0
5,0 mg/L	84,3	76,0	102,0
10,0 mg/L	80,0	76,0	102,3
12,5 mg/L	80,0	74,2	111,8

forma quelatos con grupos prostéticos de enzimas tales como catalasa, peroxidasa, citocromo y citocromo-oxidasa (Klaasen, 1988). También altera la bomba catiónica por inhibición de la Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> ATPasa en membrana y mitocondrias (Hasan, Vihko y Hernberg, 1967), entre otros efectos. Por lo tanto, se puede sugerir que el mecanismo principal responsable de los efectos descritos, radica en alteraciones en la respiración celular mitocondrial y en el transporte a través de membrana. Esto se traduce, entre otros, en una inhibición de todos los procesos dependientes de energía responsables de la proliferación y elongación celulares que dan cuenta del crecimiento radical.

Los resultados presentados, permiten concluir que plomo afecta el crecimiento radical de *Allium cepa* L. alterando fundamentalmente el proceso de elongación celular. La disminución concomitante en el consumo de oxígeno permite postular, como causa, una alteración en la respiración celular.

## RESUMEN

Se estudió el efecto de plomo sobre el crecimiento longitudinal de la raíz de *Allium cepa* L. Se analizó crecimiento longitudinal de la raíz, actividad proliferativa de la zona meristemática, elongación celular en la zona madura y consumo de oxígeno en el ápice radical. El rango de concentraciones utilizadas en este estudio incluyó la máxima permitida por el Instituto Nacional de Normalización de Chile (5 mg/L).

Se observó que plomo inhibe el crecimiento longitudinal de la raíz en forma dependiente de su concentración, produciendo alteraciones, principalmente en la elongación de las células en la zona madura de la raíz. Se postula que el efecto observado se debe a una interferencia de este metal pesado con el proceso de respiración celular.

**Palabras claves:** *Allium cepa* L., cebolla, metales pesados, proliferación, raíz.

## LITERATURA CITADA

- BARCELO, JUAN y POSCHENRIEDER, CHARLOTTE. 1989. Estrés vegetal inducido por metales pesados. *Investigación y Ciencia* 154: 54-63.
- CALVO, A., CRUZ, J. L., GUTIERREZ, C., GARCIA HERDUGO, G., GIMENEZ-MARTIN, G. and LOPEZ-SAEZ, J. F. 1982. Analysis of cell cycle in root meristems. *J. Theor. Biol.* 96: 295-308.
- COOPER, W. C., WONG, O. and KHEIFETS, L. 1985. Mortality among employees of lead battery plants and lead producing plants 1947-1980. *Scan. J. Work Environ. Health* 11(5): 331-345.
- CHANEY, R. L. 1985. Potential effects of sludge borne heavy metals and toxic organics on soils, plants and animals and related regulation guidelines. Workshop on the International Transportation and Utilization on Disposal of Sewage Sludge. Washington D.C. 12-15 Dec. 1983. Organización Panamericana de la Salud (ed.).
- CHIANG, A., JAIME. 1987. Metales pesados en alimentos de alto consumo en Chile. Quinto simposio sobre contaminación ambiental orientado hacia los alimentos Tomo I p.: 49-53.
- DATTA, S.C. and GHOSH, J.J. 1985. A study of the distribution pattern of lead in the leaves of the banjan trees (*Ficus banahalensis*) from different traffic density regions of Calcutta. *Ecotoxicol Environ. Safety* 9: 101-105.
- GONZALEZ M., SERGIO, BERGQVIST A., ENRIQUE e ITE D., REGINA. 1984. Contaminación con metales pesados del area vecina a una fundición de cobre. Catemu, V Región. *Agricultura Técnica (Chile)* 44: 63-68.
- HASAN, J., VIHKO, V. and HERNBERG, S. 1967. Deficient red cell membrane  $Na^+/K^+$  ATPase in lead poisoning. *Arch. Environ. Health* 14: 313.
- HERNANDEZ, L.M., RICO, M.C., GONZALEZ, M.S. and HERNAN, M.A. 1987. Environmental contamination by lead and cadmium in plants from urban areas of Madrid, Spain. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 38(2): 203-208.
- INIA-INSTITUTO DE INVESTIGACIONES AGROPECUARIAS. 1987. Evaluación del quinto simposio sobre contaminación ambiental orientado a los alimentos. INIA y Secretaría Ministerial de Agricultura, Región Metropolitana. V. Simposio sobre contaminación ambiental orientado a los alimentos. Santiago 22-24 Julio 1987. Tomo 2 p.: 85.
- INN-INSTITUTO NACIONAL DE NORMALIZACION DE CHILE. 1978. Requisitos de la calidad del agua para diferentes usos. Norma Chilena Oficial N.CH. 1333.I.N.N. Santiago, Chile. p.: 4.
- KLAASEN, C. D. 1988. Los metales pesados y sus antagonistas. En: Goodman, A., Goodman, L.S., Rall, T.W. y Murad, F. (ed.). *Las bases farmacológicas de la terapéutica*. Editorial Médica Panamericana, Séptima Edición p.: 1.520.
- LOURIA, D.B., JOSELOW, M.M. and BROWDER, A.A. 1972. The human toxicity of certain trace elements. *Ann. Intern. Med.* 76: 307-319.
- MENGEL, K. and KIRKBY, E.A. 1978. Plant nutrients, general functions. In: International Potash Institute (ed.). *Principles of plant nutrition*. Berna, Switzerland. P.O. Box CH-3048. p.: 16-17.
- MORALES, P. y BECKER, E. 1986. Contaminación con Mo y Pb en suelos de la región metropolitana. *Boletín de la Sociedad Chilena de Química* 28(2): 466-458.
- PEPPER B., INES, GALANTI G., NORBEL y SANS P., JORGE. 1987. Efecto de arsénico pentavalente sobre el crecimiento de la raíz de la cebolla. V Simposio sobre contaminación ambiental orientado a los alimentos. Tomo I. p.:107.
- PEPPER B., INES, GALANTI G., NORBEL, SANS P., JORGE and LOPEZ-SAEZ, J. F. 1988a. Reversible inhibition of root growth and cell proliferation by pentavalent arsenic in *Allium cepa* L. *Exp. and Environ. Botany* 28: 9-18.
- PEPPER B., INES, LEYTON M., CECILIA, SANS P., JORGE y GALANTI G., NORBEL. 1988b. Efecto de cobre sobre el crecimiento radicular de *Allium cepa* L. *Sociedad de Biología de Chile, VII Reunión Nacional de Botánica*. Valparaíso, 31 Agosto al 3 Septiembre, p.: 126.

- PEPPER B., INES, GALANTI G., NORBEL y SANS P., JORGE. 1988c. El fosfato impide el efecto inhibitorio del arsénico pentavalente sobre el crecimiento de raíces de cebolla de (*Allium cepa* L.). *Agricultura Técnica (Chile)* 48: 325-330.
- REGLAMENTO SANITARIO DE ALIMENTOS, CHILE. 1982. Diario Oficial del 4 de septiembre de 1982.
- RODRIGUEZ-CASTELLON, E. 1980. Estudio de los niveles de Pb, Cd y Ni en el suelo y la vegetación adyacente a algunas carreteras de Puerto Rico. Universidad de Puerto Rico, Depto. de Química 105 p. (Tesis para optar al grado de Maestro en Ciencias).
- SHARIATPAHANI, M. and ANDERSON, A.C. 1986. Accumulation of Cadmium, Mercury and Lead by vegetables following long term land application of wastewater. *Sci. Total Environ.* 52(1-2): 41-47.
- SOKAL, R. and ROHLY, F. 1969. The principles and practice of statistics in biological research. In: Emmerson, R., Kennedy, D., Park, R.B. Badle, W.G., Whitaker, D.M. Freeman and Company, San Francisco (ed.). *Biometry*. p.: 143-145.
- TJIO, J. M. and LEVAN, A. 1950. The use of oxiquinolone in chromosome analysis. *Ann. Estac. Exp. Aula Dei* 2: 21-64.