



ORIGINAL ARTICLE / ARTÍCULO ORIGINAL

KARYOTYPIC VARIATION AND CELLULAR MALFORMATION IN THE AFRICAN RHODES GRASS *CHLORIS GAYANA* (GRAMINEAE) IN MEXICO

VARIACIÓN CARIOTÍPICA Y MALFORMACIONES CELULARES EN EL ZACATE RHODES AFRICANA *CHLORIS GAYANA* (GRAMINEAE) EN MÉXICO

Rosa Isela De la cruz-Izquierdo¹; Javier Hernández-Guzmán^{1,2*} & Alfredo Arias-Trinidad³

¹Instituto Tecnológico Superior de Comalcalco, carretera vecinal Comalcalco-Paraíso Km 2.0, Ra. Occidente 3^{ra} Sección, CP. 86650, Comalcalco, Tabasco, México. Correo electrónico: *jhernandez-guzman@hotmail.com

²División Académica de Ciencias Biológicas, Universidad Juárez Autónoma de Tabasco, Villahermosa, CP. 86150, Tabasco, México. ³ Colegio de Postgraduados, Campus Tabasco, Periférico Carlos A. Molina s/n, C.P. 86500, H. Cárdenas, Tabasco, México.

The Biologist (Lima), 14(1), jan-jun: 65-73.

ABSTRACT

In Tabasco State, Mexico, there are several reports of the toxicological effects of contaminants with sources of organochlorine pesticides, hydrocarbons and heavy metals. All existing reports from Tabasco State (Mexico) are from wildlife, and currently there is not a report in the local flora. The technique of conventional plant root cell cytogenetics of *Chloris gayana*, African Rhodes grass common from southeastern of Mexico was utilized. Three different karyotypes were identified: $2n=10$ chromosome (four submetacentric "sm"+ six telocentric "t"), $2n=20$ chromosome (4sm+16t), and $2n=20$ chromosomes (6sm+14t). Also, from the intracellular analysis of *C. gayana*, seven malformations were identified: diploid cells, triploid cells, tetraploid cells, micronucleus, nucleoplasmic bridge, cell elongation and apoptosis. Cell defects occurred in 35.04% of 2269 cells. The variation of karyotypes in *C. gayana* can be considered abnormal according to polyploidy and evolution of the *Chloris* group, however, cells defects are attributed to exposure to particulate pollutants prevalent in the study area.

Keywords: cellular malformation – *Chloris gayana* – chromosome – karyotype – micronucleus

RESUMEN

En el Estado de Tabasco, México, existen diversos reportes de los efectos toxicológicos de contaminantes con orígenes de pesticidas organoclorados, hidrocarburos y metales pesados. Todos los reportes existentes en el Estado de Tabasco, México son en fauna silvestre y en la actualidad no existe reporte en la flora local. Se utilizó la técnica de citogenética vegetal convencional con células de raíces de la especie *Chloris gayana*, zacate común africana del sureste mexicano. Se identificaron tres cariotipos diferentes: $2n=10$ cromosomas (cuatro submetacéntricos "sm"+ seis telocéntricos "t"), $2n=20$ cromosomas (4sm+16t) y $2n=20$ cromosomas (6sm+14t). También, en el análisis intracelular de *C. gayana* se identificó la presencia de siete malformaciones: células diploides, células triploides, células tetraploides, micronúcleos, puentes nucleoplásmicos, alargamiento celular y apoptosis. El porcentaje de malformaciones celulares se registró en 35,04% de 2269 células. La variación de cariotipos en *C. gayana* puede considerarse anormal de acuerdo con las características poliploides y evolutivas del grupo *Chloris*, sin embargo, las malformaciones celulares se atribuyen a la exposición de partículas de contaminantes predominantes del área de estudio.

Palabras clave: cariotipo – cromosoma – *Chloris gayana* – malformación celular – micronúcleo.

INTRODUCCIÓN

Tabasco es uno de los estados del sureste mexicano en el cual existen diversas actividades industriales y donde se ha registrado numerosos estudios de casos del impacto de contaminantes diversos a la biodiversidad local y a la diversidad de ecosistemas (Olguín *et al.* 2007, Pinkus-Rendón & Contreras-Sánchez 2012). El impacto de la contaminación por residuos pesticidas, metales pesados e hidrocarburos ha ocasionado daños importantes en la integridad de la información genética de la biodiversidad tabasqueña, en el sur de México (Gold-Bouchot *et al.* 1995, Calva & Torres 1998, Castañeda-Chávez *et al.* 2014).

Las anomalías intracelulares se han registrado en su totalidad exclusivamente en grupos taxonómicos de la fauna nativa de Tabasco, México; ya que los estudios citogenéticos y de biología celular en general se concentran en moluscos, peces, anfibios y reptiles (Hernández-Guzmán *et al.* 2011). Las alteraciones intracelulares más comunes que se han registrado en la biodiversidad nativa, son la presencia de variación en fórmulas cromosómicas, número fundamental (NF) atípico en los cariotipos y presencia de microcromosomas tipo "B" (Arias-Rodríguez *et al.* 2009, Indy *et al.* 2010, Hernández-Guzmán *et al.* 2014). Sin embargo, no existen registros oficiales en la flora local.

La presente investigación en la especie *Chloris gayana* (Kunth), se llevó a cabo de acuerdo a la importancia internacional y local que caracteriza a la gramínea en diversos sectores agrícolas, actividad que diversos municipios del Estado de Tabasco son partícipes para el desarrollo económico y agrícola. Además, la carencia de estudios en este grupo taxonómico de la biodiversidad tabasqueña y la nula información científica local, se llevó a cabo la determinación cariotípica y análisis de

detección de malformaciones celulares en el Zacate Rhodes Africana *Chloris gayana* (Gramineae) y contribuir con información biológica inédita de la especie.

MATERIALES Y MÉTODOS

Área de estudio

La colecta de los especímenes de *C. gayana* se efectuó en el quemador de batería y compresora Castarrical (Mechón de actividad petrolera) ubicado en el poblado Zaragoza tercera sección, carretera Cocohital, municipio de Comalcalco, Tabasco, México (18°23'10.2"N y 93°18'35.8"O). Utilizando el método aleatorio simple por conglomerados en una extensión de 60 m², en la cual se trabajaron en total 36 conglomerados de 10 m².

Técnica citogenética

Se empleó el método de citogenética para plantas (Strydom & Spies 1994). La raíz fue liberada del tallo para que posteriormente en un mortero con agua destilada se disgregara el tejido. Después, se vertió la muestra obtenida en microtubos de 2,0 mL, donde las células se dejaron a exposición en solución hipotónica al 2,0% (citrato de sodio + agua destilada) dejando reposar durante 1 h. Posteriormente, se preparó solución fijadora compuesta por metanol y ácido acético en proporción 4:1, la cual se aforó a 1,5 mL, dejando reposar por 30 minutos. Después, la muestra se dejó prefijar durante 72 h. Pasado el tiempo necesario, se procedió a la centrifugación de las muestras a 7000 rpm durante 10 min. Posteriormente, se agregó 0,5 mL de solución fijadora, este proceso se llevó a cabo por tres repeticiones con 24 h de exposición y reposo. Una vez que la solución de las muestras de raíces quedaron lo más blanquecino posible, se realizaron goteos en portaobjetos desde una altura aproximada de 1,5 m, para la observación de células y dispersiones aisladas. Seguidamente, los portaobjetos fueron flameados con un

mechero para fijar las células en la placa. Una vez seca la muestra, los portaobjetos fueron tratados con colorante biológico Giemsa 10%, preparado con buffer de fosfatos pH 7,0 (Kligerman & Bloom 1977).

Análisis microscópico

Se utilizó un microscopio óptico ICB-Grupo: ICB 0043558, empleando el objetivo de 40X para realizar las búsquedas de las células y las dispersiones que estuvieran lo más disperso posible y evitando cromosomas y células traslapadas; mientras que para la toma de fotografías de las mejores representaciones de las dispersiones se empleó el objetivo 100X y se utilizó una Cámara digital Sony Dscwx 350.

Elaboración de cariotipos y estadística

Para elaborar los cariotipos se utilizó primeramente el software Photoshop CC 2015 para el conteo de los cromosomas y determinar el número modal $2n$. Las clasificación cromosómica se llevó a cabo a través de la nomenclatura de Levan *et al.* (1964). El conteo de micronúcleos en células de raíces fue expresado en porcentaje, utilizando los criterios de Prieto-García *et al.* (2006), así como las alteraciones intracelulares, realizando las mediciones en μm con el software MicroMeasure 3,3 (Reeves 2001). Además, se realizó un análisis de varianza de una vía con la prueba de Tukey ($p \leq 0,05$) para el análisis del nivel de significancia de los datos obtenidos entre complementos cromosómicos con el software SigmaStat 3.5.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Para la caracterización del nivel de ploidía en *C. gayana* se analizaron 271 dispersiones cromosómicas. El número modal diploide identificado en células de raíz de *C. gayana* fue $2n=10$ y $2n=20$ cromosomas, equivalente a 187 dispersiones del total analizadas. También, se lograron identificar diferentes

tipos de niveles de ploidía en las células de las raíces, sin embargo, estas presentaron un número bajo en frecuencia, los cuales se definieron en 17 células con $2n=16$ cromosomas, ocho células con $2n=23$ cromosomas y 26 células con $2n=25$ cromosomas.

Se identificó la presencia de tres cariotipos diferentes (cariomorfos) en *C. gayana* (Figura 1). El primer cariomorfo con $1n=10$ cromosomas, se caracterizó por poseer medidas de $0,71 \pm 0,78 \mu\text{m}$ del brazo p cromosómico y $1,46 \pm 0,97 \mu\text{m}$ de brazo q de cromosoma en su primer par birrámeo; mientras que en su último par de cromosomas presentó medidas de $1,07 \pm 0,91 \mu\text{m}$ de brazo q monorrámeo; la fórmula cromosómica correspondió a $4 sm + 6 t$ (Figura 1A). El segundo cariomorfo de *C. gayana* se caracterizó con $2n=20$ cromosomas, en el cual se identificó la presencia de cuatro cromosomas birrámeos y 16 cromosomas monorrámeos; las medidas de sus primeros pares de cromosomas fue de $0,91 \pm 0,65 \mu\text{m}$ de brazo p y $1,54 \pm 0,73 \mu\text{m}$ de brazo q en los cromosomas birrámeos, mientras que en sus últimos pares de cromosomas de tipo monorrámeo presentaron $0,56 \pm 0,56 \mu\text{m}$ de brazo q; la clasificación cromosómica del cariomorfo dos correspondió a $4 sm + 16 t$ (Figura 1B). El tercer cariomorfo también se describió con $2n=20$ cromosomas, con variación en su fórmula cromosómica: $6 sm + 14 t$; las medidas en su primer par de cromosoma birrámeo fueron $0,59 \pm 0,47 \mu\text{m}$ de brazo p y $1,01 \pm 0,66 \mu\text{m}$ de brazo q, en cuanto a su último par de cromosoma monorrámeo se describió con $0,37 \pm 0,58 \mu\text{m}$ de brazo q (Tabla 1, Figura 1C).

Para el análisis de la estructura interna de las células, se estudiaron 2269 células de las raíces de *C. gayana*, en el cual se descubrieron en 795 células siete anomalías intracelulares (Figura 2): 353 células binucleadas con 15,56% del total analizadas (Figura 2A), 87

células trinucleadas con 3,83% (Figura 2B), 32 células tetranucleadas con 1,41% (Figura 2C), 56 micronúcleos con promedio de $2,14 \pm 0,43 \mu\text{m}$ (2,47%) (Figura 2D), 16 puentes nucleoplásmicos (0,71%), 75 células con alargamiento de pared celular (3,31%) (Figura 2E) y 176 células en estado de apoptosis (7,76%) (Figura 2F), mientras que 1474 que representan 64,96% del total analizadas carecieron de algún tipo de alteración celular.

La descripción de la variación cariotípica en una población de *C. gayana*, descrito en el presente documento como “cariomorfo”, cumple con las características citogenéticas descritas por Strydom & Spies (1994) para células somáticas con $2n=20$ cromosomas (cariomorfo II: $4sm+16t$; cariomorfo III: $6sm+14t$). El cariomorfo I ($2n=10$ cromosomas) es descrito como una condición atípica del material genético encontrado en las células de *C. gayana*, ya que reportes cromosómicos en la especie por Spies & Jonker (1987), Strydom & Spies (1994) y Alcocer *et al.* (2005) señalan a la condición $2n=20$ cromosomas como el número cromosómico estandarizado para *C. gayana*. La comparación cromosómica entre especies del género *Chloris* es prácticamente imposible por la carencia de información estadística citogenética en los antecedentes del grupo

taxonómico, aunado a la situación, el presente estudio representa el primero para el Estado de Tabasco, México; a pesar de la escases de investigaciones en la especie particular, el análisis de varianza de una vía con prueba Tukey, permitió describir que entre los cromosomas de las células de *C. gayana* de la población de Zaragoza, en el municipio de Comalcalco, Tabasco, México no existen diferencias significativas entre ellas a una probabilidad de $p \leq 0,05$.

Además, Strydom & Spies (1994) señalan que especies que se ubican en el género *Chloris* usualmente están caracterizados por el nivel de ploidía $2n=10$ cromosomas, a excepción de *C. gayana* y *C. virgata* (Kunth). También, se ha señalado que las especies *Chloris* presentan comúnmente células poliploides que van de 14 hasta 54 cromosomas, las cuales varían entre las especies de gramíneas como *Eustachys paspaloides* (Lanza & Mattei), *Cynodon dactylon* (L.) y *Dichanthium sp* (Forssk.) de acuerdo con de Wet & Harlan (1970), de Wet (1986), Strydom & Spies (1994) y Quero-Carrillo *et al.* (2010), por lo que, la variedad en frecuencias del nivel de ploidía en el presente trabajo puede ser explicado por la propiedad poliploide de las gramíneas, sin embargo, el descubrimiento de malformaciones celulares y alteraciones intracelulares en una población

Tabla 1. Longitudes cromosómicas en μm de la variación cariotípica en *Chloris gayana*.

N	Cariomorfo I			Cariomorfo II			Cariomorfo III		
	p±D.E.	q±D.E.	C.	p±D.E.	q±D.E.	C.	p±D.E.	q±D.E.	C.
1	0,71±0,78	1,46±0,97	sm	0,91±0,65	1,54±0,73	sm	0,59±0,47	1,01±0,66	sm
2	0,48±0,57	1,12±0,90	sm	0,38±0,76	1,09±0,58	sm	0,47±0,59	0,86±0,45	sm
3		1,26±0,68	t		1,90±0,54	t	0,33±0,23	0,61±0,56	sm
4		1,19±0,77	t		1,76±0,33	t		0,91±0,33	t
5		1,07±0,91	t		1,14±0,67	t		0,87±0,45	t
6					1,04±0,53	t		0,71±0,62	t
7					1,02±0,43	t		0,62±0,20	t
8					0,95±0,67	t		0,56±0,43	t
9					0,57±0,48	t		0,45±0,67	t
10					0,56±0,56	t		0,37±0,58	t

N= número de par cromosómico, p= brazo corto de cromosoma, q= brazo largo de cromosoma, D.E.= Desviación estándar, C= clasificación cromosómica.

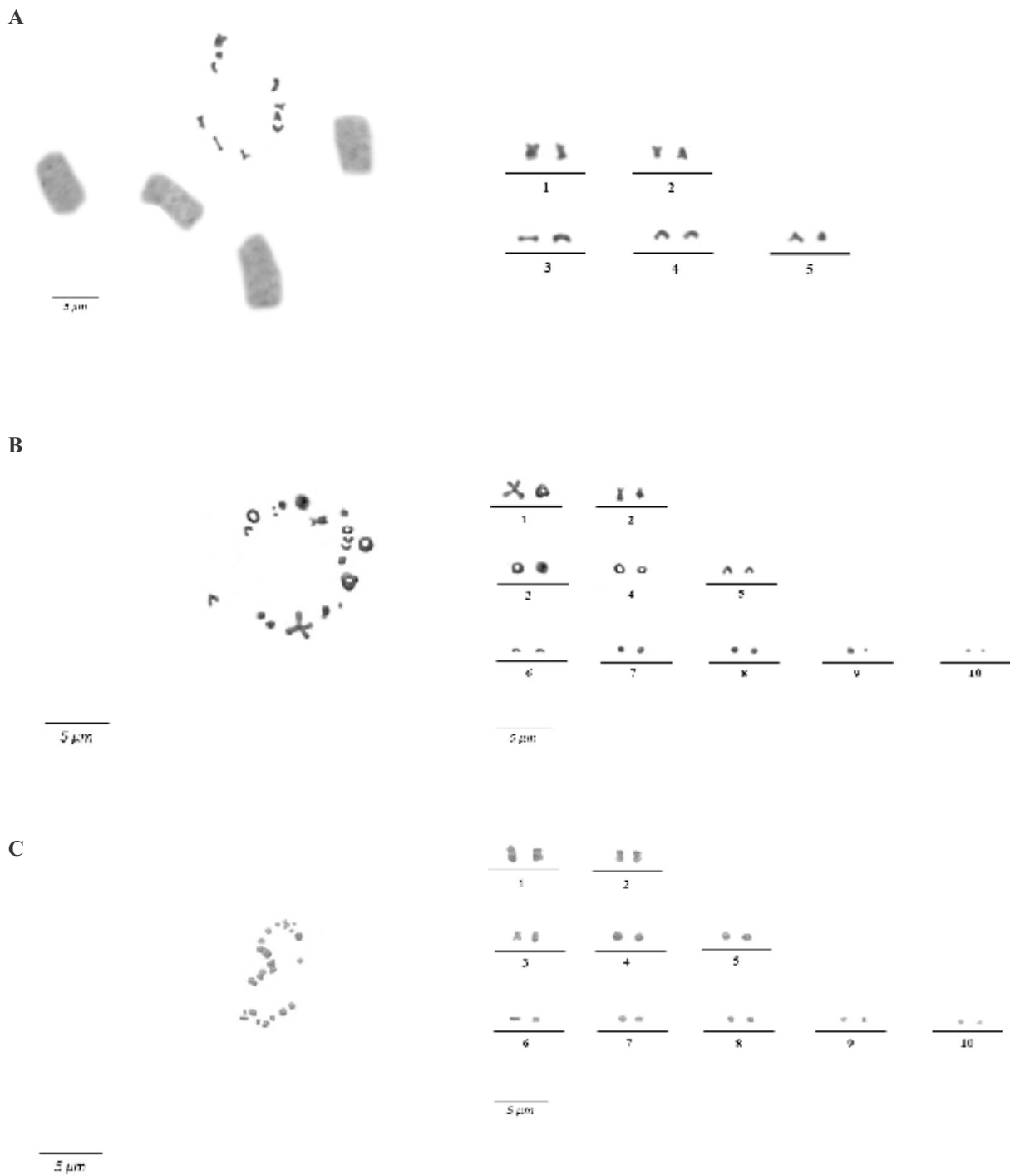


Figura 1. Dispersión y cariotipo 2n=10 cromosomas (A), 2n= 20 cromosomas (B) y 2n=20 cromosomas con variación carotípica (C) en *Chloris gayana* de Tabasco, México.

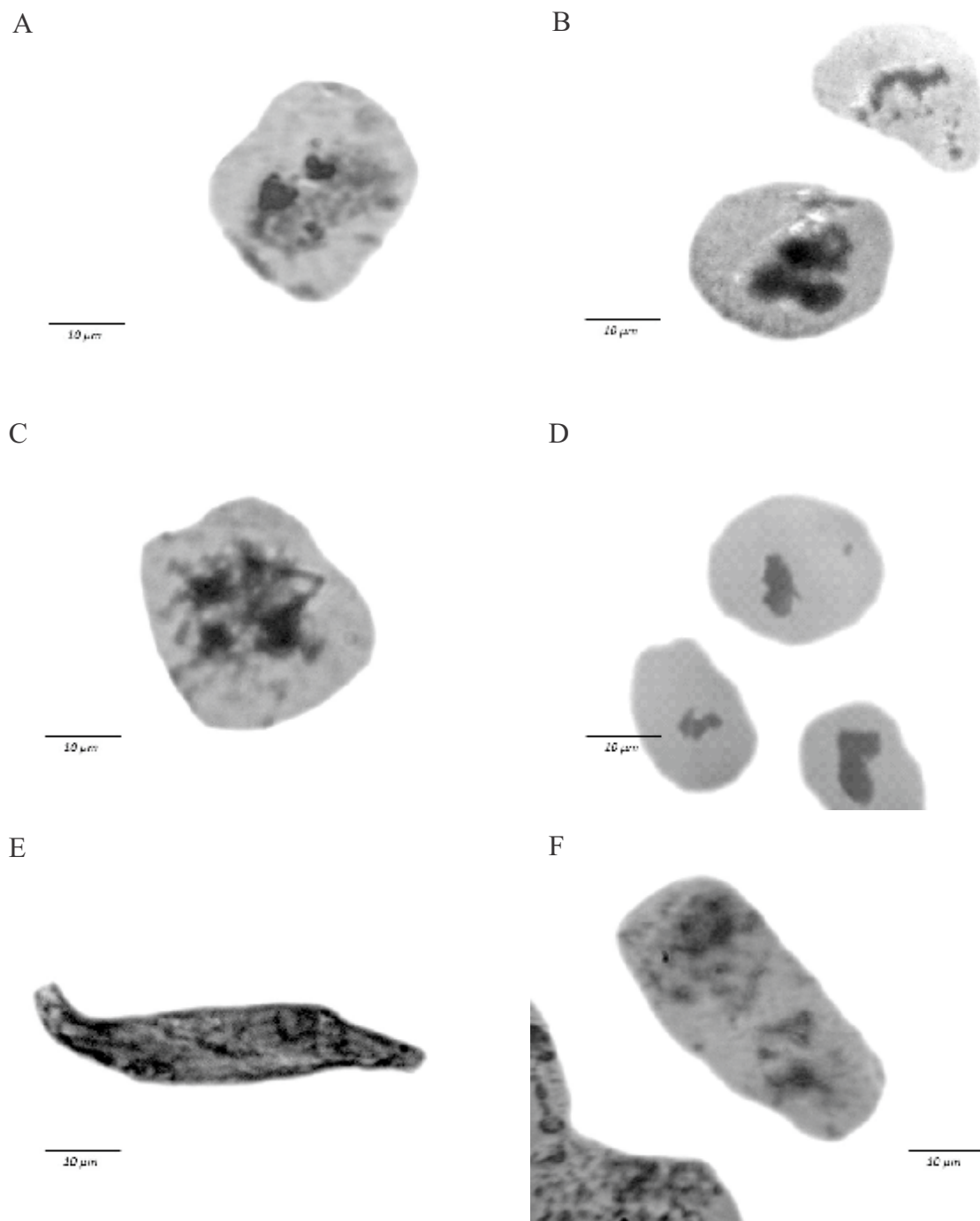


Figura 2. Malformaciones celulares: célula con dos núcleos (A), célula con tres núcleos (B), célula con cuatro núcleos (C), micronúcleo (D), alargamiento celular (E) y apoptosis (F) en *Chloris gayana* de Tabasco, México.

natural de *C. gayana* descarta una posibilidad similar.

En todos los estudios previos de citogenética aplicada al género *Chloris* no han reportado la existencia de anomalías celulares en poblaciones naturales, a excepción del estudio de Strydom & Spies (1994) donde se describe en células mitóticas la variación de cromosomas supernumerarios con frecuencia de 0-4 “microcromosomas tipo B” en *C. gayana*, los cuales son descartados en la presente investigación. Sin embargo, existen estudios de bioensayos de genotoxicidad de metales pesados como el arsénico (Prieto-García *et al.* 2006, 2007) e inducción de micronúcleos y daños a la integridad celular en especies de plantas y productos de interés agrícola, uso medicinal y comercial, como en *Peganum harmala* (L.), *Vicia faba* (L.), *Paspalum maritimum* (L.) y *Allium cepa* (L.) (Adamowski *et al.* 2000, Pierre & Betancourt 2007, Shahid *et al.* 2011, Mekki 2013). Así como también la presencia de tétradas anormales durante la microsporogénesis (Adamowski *et al.* 2000, Mendes-Bonato *et al.* 2006).

En otro contexto y con la necesidad de obtener algún significado de la extensa variedad de malformaciones intracelulares en *C. gayana* de la localidad de Zaragoza, en el municipio de Comalcalco, Tabasco, México, se investigó adicionalmente el probable origen de la particularidad celular de la gramínea, dejando descartada, la presencia de partículas de plaguicidas y metales pesados, puesto que es una zona restringida de cualquier actividad agrícola y pecuaria, ya que es un área de alto monitoreo de petróleo en el sureste de México, por lo que la hipótesis del origen de las alteraciones celulares en la especie *C. gayana* se orienta al agua pluvial ácida originada por la actividad petrolera o derrames subterráneos de los ductos petrolíferos, ya que los registros (investigación de complemento al análisis citogenético) obtenidos de las aguas pluviales

de la zona corresponden a $4,83 \pm 0,10$ de pH en comparación de zonas extremas del Estado de Tabasco, México, en la cual se registró $6,81 \pm 0,15$ de pH. De encontrarse la presencia de residuos de gas sulfhídrico o residuos de hidrocarburos en los tejidos vegetales de *C. gayana* no solo se estaría confirmando la presente hipótesis sobre la magnitud del daño genotóxico de dichos residuos, sino que a través de las aguas pluviales o derrames subterráneos, estaría afectando la integridad de la salud de la flora, fauna y salud humana de las áreas cercanas a las actividades de quema de hidrocarburos, situación que se ha reportado con diversas especies de plantas y hongos de distribución diversa (Oyundari 2008, Díaz-Godínez 2009, Gheorghe & Ion 2011).

En conclusión, el análisis citogenético en la gramínea *C. gayana* confirmó el número total de cromosomas que han reportado otros autores en la misma especie, así como el descubrimiento de un cariotipo atípico. Además, se identificó la presencia de variedades de malformaciones intracelulares con porcentaje elevado (35,04%) del total de células analizadas. A pesar de la cantidad de alteraciones en las células, no se identificaron características fenotípicas particulares en la morfología de la gramínea. También, el estudio de complemento de los niveles de pH de aguas pluviales en la zona de colecta de *C. gayana* permitió generar nuevas hipótesis sobre el impacto genotóxico que se ha provocado en la especie, recomendando además, incrementar los esfuerzos de investigación en *C. gayana* y en la biodiversidad local.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Adamowski, E.V.; Pagliarini, M.S. & Batista, L.A.R. 2000. Chromosome number and microsporogenesis in *Paspalum maritimum* (Caespitosa Group:

- Gramineae). Brazilian Archives of Biology and Technology, 43: 301-305.
- Alcocer, G.; Pérez, P.G.; García Posse, F.R. & Devani, M.R. 2005. Determinación de estabilidad de la producción de cultivares de *Clhoris gayana* Kunth en Tucumán y zonas de influencia. Revista Industrial y Agrícola de Tucumán, 82: 55-58.
- Arias-Rodríguez, L.; Páramo-Delgadillo, S.; Contreras-Sánchez, W.M. & Álvarez-González, C.A. 2009. Cariotipo del pejelagarto tropical *Atractosteus tropicus* (Lepisosteiformes: Lepisosteidae) y variación cromosómica en sus larvas y adultos. Revista de Biología Tropical, 57: 529-539.
- Calva, L.G. & Torres, M.R. 1998. Plaguicidas organoclorados. ContactoS, 30: 35-46.
- Castañeda-Chavez, M.R.; Navarrete-Rodríguez, G.; Lango-Reynoso, F.; Galaviz-Villa, I. & Landeros-Sánchez, C. 2014. Heavy metals in oysters, shrimps and crabs from lagoon systems in the Southern Gulf of Mexico. Journal of Agricultural Science, 6: 108-117.
- De Wet, J.M.J. 1986. Hybridization and polyploidy in the Poaceae. pp.188-194. In: Soderstrom, T.R.; Hilu, K.W.; Campbell, C.S.; & Barkworth, M.E. (eds). *Grass systematic and evolution*. 1st ed. Washington, DC USA. Smithsonian Institution Press.
- De Wet, J.M.J. & Harlan, J.R. 1970. Apomixis, polyploidy, and speciation in *Dichanthium*. Evolution, 24: 270-277.
- Díaz-Godínez, R. 2009. Efecto del pH inicial de desarrollo de *Pleurotus ostreatus* en fermentación sumergida sobre su actividad de la casasa. Tesis de Maestría en Ciencias en Biotecnología Aplicada. Instituto Politécnico Nacional, México.
- Gheorghe, I.F. & Ion, B. 2011. The effects of Air Pollutants on vegetation and the role of vegetation in reducing atmospheric pollution. The Impact of air pollution on health, economy, environment and agricultural sorces. Intech China Press.
- Gold-Bouchot, G.; Simá-Alvarez, R.; Zapata-Pérez, O. & Güemez-Ricalde, J. 1995. Histopathological effects of petroleum hydrocarbons and heavy metal on the american oyster (*Crassostrea virginica*) from Tabasco, Mexico). Marine Pollution Bulletin, 31: 439-445.
- Hernández-Guzmán, J.; Arias-Rodríguez, L. & Indy, J.R. 2011. Los cromosomas meióticos de la rana arborícola *Smilisca baudinii* (Anura: Hylidae). Revista de Biología Tropical, 59: 355-363.
- Hernández-Guzmán, J.; Indy, J.R.; Yasui, J.G. & Arias-Rodríguez, L. 2014. Los cromosomas de las tortugas tropicales: *Kinosternon leucostomum*, *Trachemys scripta* y *Saturotyphus triporcatus* (Testudines: Kinosternidae/Emydidae). Revista de Biología Tropical. 62: 671-688.
- Indy, J.R.; Arias-Rodríguez, L.; Páramo-Delgadillo, S.; Hernández-Vidal, U.; Álvarez-González, C.A. & Contreras-Sánchez, W.M. 2010. Mitotic karyotype of the tropical freshwater crayfish *Procambarus (Austrocambarus) llamasi* (Decapoda: Cambaridae). Revista de Biología Tropical, 58: 655-662.
- Kligerman, A.D. & Bloom, S.E. 1977. Rapid chromosome preparations from solid tissues of fishes. Journal of the Fisheries Research Board of Canada, 34: 266-269.
- Levan, A.; Fredga, K. & Sandberg, A.A. 1964. Nomenclature for centromeric position on chromosomes. Hereditas, 52: 201-220.
- Mekki, L. 2013. Effects of crude aqueous and ethanolic extracts of *Peganum harmala* L. seeds on cytogenetical and growth traits of *Vicia faba* L. plants. African Journal of Biotechnology Research, 2: 35-44.
- Mendes-Bonato, A.B.; Pagliarini, M.S. & do Valle, C.B. 2006. Abnormal spindle orientation during microsporogenesis in an interspecific *Bachiaria* (Gramineae)

- hybrid. *Genetics and Molecular Biology*, 29: 122-125.
- Olguín, E.J.; Hernández, M.E. & Sánchez-Galván, G. 2007. Contaminación de manglares por hidrocarburos y estrategias de biorremediación, fitorremediación y restauración. *Revista Internacional de Contaminación Ambiental*, 23: 139-154.
- Oyundari, B. 2008. *Spectral indicators for assesing the effect of hydrocarbon leakage on vegetation*. Thesis of Master of Science in Geoinformation Science and Earth Observation. International Institute for Geoinformation Science and Earth Observation Enschede. Netherlands.
- Pierre, F. & Betancourt, P. 2007. Residuos de plaguicidas organoclorados y organofosforados en el cultivo de cebolla en la depresión de Quíbor, Venezuela. *Bioagro*, 19: 69-78.
- Pinkus-Rendón, M.J. & Contreras-Sánchez, A. 2012. Impacto socioambiental de la industria petrolera en Tabasco: El caso de la Chontalpa. *LiminaR*, 10: 122-144.
- Prieto-García, F.; Callejas-Hernández, J.; Román-Gutiérrez, A.D.; Prieto-Méndez, J.; Gordillo-Martínez, A.J. & Méndez-Marzo, M.A. 2007. Acumulación de arsénico en el cultivo de habas (*Vicia faba*). *Agronomía Costarricense*, 31: 101-109.
- Prieto-García, F.; Lechuga-Vargas, M.A.; Méndez-Marzo, M.A.; Barrado-Esteban, E. & Gaytán-Oyarzún, J.C. 2006. Daños tóxicos en tejidos vegetales, producidos por aguas contaminadas con arsénico en Zimapán, Hidalgo, México. *Ciência e Tecnologia de Alimentos (Campinas)*, 26: 94-97.
- Quero-Carrillo, A.R.; Enríquez-Quiroz, J.F.; Morales-Nieto, C.R. & Miranda-Jiménez, L. 2010. Apomixis y su importancia en la selección y mejoramiento de gramíneas forrajeras tropicales. Revisión. *Revista Mexicana de Ciencias Pecuarias*, 1: 25-42.
- Reeves, A. 2001. MicroMeasure: A new computer program for the collection and analysis of cytogenetic data. *Genome*, 44: 439-443.
- Shahid, M.; Pinelli, E.; Pourrut, B.; Silvestre, J. & Dumat, C. 2011. Lead-induced genotoxicity to *Vicia faba* L. roots in relation with metal cell uptake and initial speciation. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 74: 78-84.
- Spies, J.J. & Jonker, A. 1987. Chromosome studies on African plants. *Bothalia*, 17: 135-136.
- Strydom, A. & Spies, J.J. 1994. A cytotoxic study of some representatives of the tribe Cynodonteae (Chloridoideae). *Bothalia*, 24: 92-96.

Received November 23, 2015.
Accepted February 26, 2016.