

Valoración del efecto tóxico del cadmio en células meristemáticas de cebolla *Allium cepa* L.

Valoration of toxic effect of cadmium in meristematic cells of onion *Allium cepa* L.

L. Marcano¹, I. Carruyo, X. Montiel, M. Bracho y L. M Soto

Resumen

Se evaluó la correlación entre diferentes concentraciones y tiempo de exposición a Cadmio, sobre el crecimiento de la raíz, bloqueo del Índice Mitótico (IM) y la inducción de aberraciones cromosómicas en poblaciones de células meristemáticas de cebolla, *Allium cepa* L. Las raíces crecidas en agua filtrada a 25°C, se colocaron en solución acuosa de Cloruro de Cadmio a diferentes concentraciones y tiempos. Los resultados mostraron una correlación positiva entre la concentración y tiempo sobre la longitud de la raíz y el IM. Se produjeron también diferentes tipos de aberraciones cromosómicas: efectos c-mitóticos, rupturas cromosómicas, stickiness y puentes anafásicos. El análisis de varianza estableció un efecto más deletéreo del tiempo de exposición que de la concentración del metal para todos los parámetros evaluados; a excepción de la formación de puentes anafásicos que presentó correlación positiva con la concentración y el efecto c-mitótico que no se correlacionó con los parámetros establecidos. También se estableció correlación positiva entre stickiness y formación de puentes anafásicos y con ruptura cromosómica. Se concluye que el efecto tóxico del Cd⁺² en la población de células estudiadas es más dependiente del tiempo de exposición al metal que de la concentración utilizada y se corrobora las ventajas del uso de los meristemas de *Allium cepa* como modelo biológico para el estudio de contaminación por metales pesados.

Palabras clave: células meristemáticas, *Allium cepa*, cadmio, toxicidad.

Abstract

The effects of Cadmium over populations of *Allium cepa* were investigated in order to discover the correlation between concentration and time over root growth, interruption of Mitotic Index (MI) and induction of chromosomal aberrations (CA). Meristematic cells were grown in filtered water at 25°C and immerse in cadmium chloride under different concentrations and time exposure.

Recibido el 11-05-1999 ● Aceptado el 16-07-1999

1. La Universidad del Zulia. Facultad de Ciencias. Departamento de Biología. Telef ax (061) 598110. 483012. e-mail: letty@iamnet.com.

Results showed a positive correlation between concentration and time of exposure on the length of the root and MI. The analysis of variance demonstrated a more deleterious effect of exposure time than concentration of cadmium used. Each time and metal concentration used produced different types of CA: C-Mitotic effect, chromosomic rupture, stickiness and anaphasic bridges. The results of the variance analysis showed variations for each CA, but only the formation of anaphasic bridges have a positive correlation to concentration. All other CA produced correlate significantly with exposure time, except for the c-mitotic effect. It is also found a positive correlation between stickiness and formation of anaphasic bridges, and stickiness and chromosomic rupture. It was concluded that toxic effect of cadmium in the cell population studied is more dependent on the exposure time than on the concentration of metal used.

Key Words: meristematic cells, *Allium cepa*, cadmium, toxicity.

Introducción

El cadmio es un metal pesado presente, de una forma ubicua, en todos los alimentos a concentraciones bajas; la dosis más elevada se encuentra en los alimentos de origen vegetal (200 mg/kg de peso seco), siguiendo en orden descendiente carnes y pescados (50 mg/kg) y los lácteos y huevos donde la concentración es mucho menor (20). Sin embargo, algunos alimentos pueden contener concentraciones más elevadas de cadmio, entre los que se encuentran los órganos internos de los animales, que pueden llegar a contener más de 1 mg/kg (7).

Aunque la presencia del Cadmio en la naturaleza es baja (0,1 – 0,2 ppm), presenta características particulares (prolongada vida media y poder de acumulación), que conducen a considerarlo como un agente causal de contaminación ambiental muy relacionado con los problemas de salud ocupacional (2). Con el desarrollo de la industria moderna, la producción y el uso del cadmio se ha extendido rápidamente, y su eliminación se ha

convertido en un problema ambiental. La industria de la galvanoplastia, la fabricación de baterías, y la estabilización de algunos plásticos son los usos más habituales de este metal, siendo utilizado también en la elaboración de algunos plaguicidas y fertilizantes. (3, 9). Para las personas no expuestas ocupacionalmente, la alimentación y el tabaco constituyen la principal fuente de exposición (1), por ejemplo se consume hasta 20 mg de cadmio por cada 20 cigarrillos consumidos; por otro lado, los granos y verduras pueden presentar concentraciones del metal considerables si se cultivan en lugares contaminados ya que el metal puede acumularse en los tejidos vegetales; así mismo la ingesta de peces, crustáceos y otros animales acuáticos, producen la acumulación del metal en el humano, principalmente en tejidos blandos como hígado y riñón. (15; 20)

Entre las alteraciones producidas por el Cadmio en diferentes tejidos y cultivos celulares se puede mencionar: alteraciones del sistema óseo (1, 19,

21); alteraciones de la función renal (11), cambios morfológicos y fisiológicos de hepatocitos (12), alteraciones en gónadas (18), efecto genotóxico y mitotóxico en tejido vegetal (16; 17; 24).

Investigaciones previas han sugerido que el estudio de las alteraciones en el Índice Mitótico (IM), bloqueo del crecimiento e inducción de aberraciones cromosómicas (AC), son dosímetros biológicos para el estudio potencial de sustancias mutagénicas y carcinogénicas presentes en el ambiente como contaminantes (6; 17;

24). En experiencias previas realizadas en nuestro laboratorio, se demostró la genotoxicidad del Cd^{+2} en células meristemáticas de *Allium cepa* (16). Sobre la base de estos resultados se desarrolló un experimento que permitiera establecer la influencia de la concentración y el tiempo de exposición del cadmio sobre la longitud de la raíz, el IM e inducción de AC con el objeto de evaluar cual de los dos tratamientos tiene un mayor efecto deletéreo en células meristemáticas de cebolla *Allium cepa* L.

Materiales y métodos

Como material de estudio se utilizaron meristemas de cebolla *Allium cepa* L. considerado como uno de los mejores modelos biológicos para el estudio del efecto de contaminantes ambientales (6; 14).

Los bulbos de cebolla se colocaron en agua filtrada renovada cada 24 horas, a temperatura constante de $25^{\circ}C \pm 0,5^{\circ}C$ y aireación continua a razón de 10 - 20 ml de aire por minuto. Una vez que las raíces alcanzaron de 2 a 3 cm de longitud se colocaron en una solución acuosa de cloruro de cadmio (Merck), a concentraciones de 0, 7, 10, 15 y 20 ppm, renovada cada 24 horas, por 0, 12, 24, 48 y 72 horas de exposición para cada una de las concentraciones utilizada. Los ensayos fueron realizados por duplicado y con su respectivo control (representados en el texto como 0 ppm y 0 horas), en el cual la solución de cadmio fue sustituida por agua destilada. Las raíces fueron medidas una por una y para cada tiempo y concentración se cortaron cuatro raíces para realizar el estudio citológico, para

lo cual se fijaron en una mezcla de alcohol-ácido acético glacial a una proporción 3:1 por 24 horas, se lavaron con agua destilada por tres veces, para luego ser teñidas por la técnica de fucsina básica (13) y/o orceína acético-clorhídrica (22). Posteriormente se realizó el aplastamiento o «squash» para el estudio de IM y AC. Se analizaron un promedio de 3000 células por meristemo, determinando a su vez las anomalías cromosómicas de las células en división.

Análisis estadístico. Con los datos recolectados se realizó un análisis de correlación simple para determinar el efecto del tiempo de exposición y concentración del Cd^{+2} sobre los diferentes parámetros evaluados: Índice Mitótico, Longitud de la Raíz y Aberraciones Cromosómicas. Así mismo se realizó análisis de varianza multivariado (MANOVA), para determinar cual de los dos factores (tiempo de exposición y concentración de cadmio) tenía mayor efecto sobre el crecimiento de las raíces.

Resultados y discusión

Efecto del cadmio sobre la longitud de la raíz. El análisis de los resultados mostró una correlación positiva altamente significativa entre longitud de la raíz con respecto al tiempo, cuando las raíces no estaban sometidas al tratamiento con cadmio ($r = 0,9759$; $P < 0,01$). El coeficiente de determinación ($R^2 = 95,24\%$) indicó que un 95,24% de las variaciones observadas en la longitud de la raíz se debieron al paso del tiempo. Esto es considerado como el proceso normal de crecimiento de las raíces de cebolla bajo las condiciones empleadas en este estudio. El cuadro 1 muestra las correlaciones existentes entre la longitud de la raíz y el tiempo a las diferentes concentraciones de cadmio, se observa una disminución paulatina del coeficiente de correlación a medida que aumenta la concentración, esto explica que, al someter las raíces a diferentes concentraciones de cadmio, el proceso de crecimiento normal de éstas se ve afectado, aún cuando dicho crecimiento continúe.

La relación entre la concentración de Cd^{+2} y la longitud de la raíz es positiva y altamente significativa para todas las concentraciones de Cd^{+2} utilizadas. Se observa que, concentraciones a partir de 15 ppm del metal influyen sobre el crecimiento de la raíz, ya que para los mismos tiempos de muestreo, el coeficiente de determinación (R^2) ha disminuido de 95,24% (0 ppm) a 51,34% (15 ppm) lo cual parece indicar un efecto deletéreo de la concentración de Cd^{+2} sobre la longitud de la raíz para esta concentración. Esto coincide con los

reportes de otros autores quienes establecen el efecto tóxico del cadmio en otros cultivos celulares, reflejado por un bloqueo en el crecimiento de las raíces, tales como en el género *Helianthus* (4), *Vicia fava* (17), *Hordeum vulgares* (24), entre otros. La alta toxicidad del metal a concentraciones bajas podría explicarse debido a que el poder de penetración del Cd^{+2} en las plantas es mucho mayor que el de otros metales pesados (8).

Interacción entre la concentración de cadmio y tiempo de exposición con respecto a la longitud de la raíz. Los resultados del análisis de MANOVA, para el estudio del efecto de la concentración del Cd^{+2} y del tiempo de exposición sobre la longitud de la raíz, se muestran en el cuadro 2, ambos efectos son significativos ($P < 0,01$). Sin embargo, el efecto del tiempo de exposición fue de 1,58 veces mayor que el efecto de la concentración, por lo que se puede establecer que el efecto de prolongar el tiempo de exposición a bajas concentraciones de cadmio es más significativo, que a concentraciones altas por poco tiempo de exposición. Esto puede explicarse debido a las propiedades que presenta el metal al acumularse, hasta alcanzar un umbral de toxicidad a partir del cual el efecto se hace más evidente (5). Se establece que en humanos, cuando se alcanzan niveles críticos en la sangre (más de 100 mg/gr de tejidos), se producen nefropatías, proteinurias, etc (10). Esta concentración crítica puede ser alcanzada eventualmente si existe un periodo de tiempo prolongado

Cuadro 1. Coeficiente de correlación (r), nivel de significancia (P) y coeficiente de determinación (R²) al relacionar longitud de la raíz versus concentración de cadmio a diferentes tiempos.

Concentración de Cd ⁺²	r	P	% R ²
0	0,9759	< 0,01	95,24
7	0,9652	< 0,01	93,17
10	0,9714	< 0,01	94,37
15	0,7165	< 0,01	51,34
20	0,6044	< 0,01	36,53

de exposición, debido a que, el metal se acumula de manera continua, de tal forma que concentraciones consideradas como bajas (5-10 ppm) pueden ser tóxicas si los animales son expuestos por periodos prolongados (20; 21; 23). Resultados similares han sido reportados en otras plantas (4; 17; 24).

Efecto del cadmio sobre el Índice Mitótico. El Índice Mitótico se considera como un parámetro que refleja la frecuencia de la división celular y la velocidad de crecimiento de los meristemos. Como se describió en la metodología, todos los experimentos se llevaron a cabo cuando las raíces alcanzaron una longitud de 2 a 3 cm; longitud a la cual los meristemos alcanzan un equilibrio dinámico en nuestras condiciones experimentales, es decir, el número de células que entran

a división es proporcional al número de células que entran a diferenciación, estableciéndose un IM con un valor constante que varía entre 11 – 12 % (16).

El cuadro 3 muestra los resultados obtenidos cuando se correlacionó el índice mitótico con la concentración de cadmio a los diferentes tiempos, se puede observar que, para las raíces sin tratamiento se encontró una correlación negativa altamente significativa entre el tiempo y el IM ($r = 0,4902$; $P \leq 0,01$) por lo que, para el tamaño de las raíces seleccionadas el IM disminuye con el transcurso del tiempo para estas raíces, lo cual puede ser explicado por el hecho de que con el transcurso del tiempo se pierde el equilibrio dinámico, de manera que el número de células

Cuadro 2. Análisis de varianza del efecto de la concentración y tiempo de exposición al Cd⁺² sobre la longitud de la raíz.

Fuente de variación	Suma de cuadrado	Gl medios	Cuadrados	F	P
Concentración de Cd ⁺²	181,02	4	45,25	63,04	< 0,01
Hora	285,11	4	71,28	99,28	< 0,01
Residual	166,55	232	0,718	-	-

que pasan a diferenciación supera a las que entran a división.

A partir de 7 ppm se observa una disminución en el IM de una manera altamente significativa a medida que aumenta la concentración, lo cual indica la dependencia del IM con la concentración de Cd^{+2} . Esto se corrobora al observar los valores del coeficiente de determinación (R^2), donde se muestra que, a medida que aumenta la concentración de cadmio se incrementa la dependencia de las variaciones en el IM, lo cual va acorde con lo mencionado anteriormente y con los reportes de otros autores en diversos sistemas biológicos. (5; 11; 18; 24).

Interacción entre la concentración de cadmio y el tiempo de exposición sobre el Índice Mitótico. El análisis de varianza (cuadro 4) muestra el efecto de la concentración de Cd^{+2} y el tiempo de exposición sobre el Índice Mitótico, se observa que, al igual que con la longitud de la raíz, el efecto tóxico es más dramático a bajas concentraciones de Cd^{+2} y prolongados tiempos de exposición, esto era de esperarse si se considera que, tanto el IM como la longitud de la raíz son medidas de crecimiento, lo cual fue afianzado con los resultados del MANOVA para el IM. Los resultados concuerdan con los reportados por otros autores. (18; 21; 23) y explicarían la extrema toxicidad que presenta este metal en las células expuestas, que lo llevan a ser considerado como un agente causal de varias enfermedades (6).

Efecto del cadmio sobre la inducción de Aberraciones Cromosómicas. Estudios previos han

reportado el efecto genotóxico del cadmio, reflejado por la inducción de diferentes aberraciones cromosómicas (16). El cuadro 5 muestra la frecuencia de aberraciones causadas por diferentes tiempos y concentraciones de Cd^{+2} en los meristemos, se puede observar que se inducen cambios morfológicos en los cromosomas para todos los tiempos y concentraciones utilizadas. A bajas concentraciones se produce stickiness producto del doblamiento erróneo de las cromátidas hermanas, que permanecen unidas por puentes subcromatínicos, originando otras aberraciones conocidas como puentes anafásicos y rupturas cromosómicas, también observadas en las células tratadas. Como se puede observar estas aberraciones aumentan su frecuencia a medida que aumenta el tiempo de exposición. Otras anomalías: cromosomas aislados, efecto c-mitótico y micronúcleos también se hacen evidentes. Estos cambios morfológicos o aberraciones cromosómicas son indicadores de alta toxicidad y probablemente conduzcan a la muerte de la célula (6; 16). En condiciones similares otros autores (14; 24), han reportado diferencias en cuanto al tipo y frecuencia de estas aberraciones aunque en proporciones similares; lo que lleva a considerar que se dan variaciones entre especies, posiblemente por efecto del medio de cultivo y/o ambiente en el que crecen los bulbos; en cualquier caso, en las condiciones ensayadas, el material biológico utilizado resultó idóneo para realizar estudios de contaminación por metales pesados ya que además de su sensibilidad presenta otras características como son: bajo costo,

Cuadro 3. Coeficiente de correlación (r), nivel de significancia (p) y coeficiente de determinación (R²) al relacionar índice Mitótico con concentración de cadmio a diferentes tiempos.

Concentración de Cd ⁺²	r	P	R ²
0	-0,4902	< 0,01	24,03
7	-0,9678	< 0,01	93,67
10	-0,9005	< 0,01	81,09
15	-0,9189	< 0,01	84,46
20	-0,8714	< 0,01	75,93

fácil manipulación y gran número y tamaño de los cromosomas.

Interacción entre la concentración de cadmio y el tiempo de exposición sobre la inducción de aberraciones Cromosómicas. Los resultados del análisis realizado por una prueba de Duncan para medir el efecto del cadmio a una sola concentración (10 ppm) y diferentes tiempos o el efecto de diferentes concentraciones a un mismo tiempo (24 h), se muestran en los cuadros 6 y 7. Se observó un incremento de la frecuencia de aberraciones con el transcurso del tiempo, el cual se hace más significativo después de 24 horas de tratamiento (cuadro 6). De forma similar, a partir de 10 ppm, al aumentar la concentración de Cd⁺² se produce un incremento significativo de la frecuencia de aberraciones

cromosómicas (cuadro 7). Como se puede observar en el cuadro 8, sólo la formación de puentes anafásicos presenta una correlación positiva y significativa con la concentración de Cd⁺² utilizada ($r=0,473$; $P\leq 0,05$). Esto puede ser explicado, ya que la stickiness es la anomalía cromosómica más frecuente presente para todos los tiempos y concentraciones utilizadas (cuadro 5); y siendo la formación de puentes anafásicos una consecuencia de este fenómeno, es de esperar que presenten una correlación con la concentración del metal.

El cuadro 9, muestra la correlación positiva con el tiempo para todas las aberraciones inducidas por el Cd⁺², excepto para el efecto C-mitótico, lo cual podría ser explicado si se considera que el cadmio es un metal antagonista del calcio, este último in-

Cuadro 4. Análisis de varianza de la concentración y el tiempo de exposición al Cd⁺² como el Índice Mitótico

Fuente de variación	Suma de cuadrado	Gl	Cuadrados medios	F	P
Concentración de Cd ⁺²	1731,860	4	432,92	144,85	< 0,01
Hora	2579,820	4	644,96	215,77	< 0,01
Residual	699,435	234	2,989	-	-

Cuadro 5.- Frecuencia de anomalías cromosómicas a diferentes tiempos y concentraciones de cadmio.

Tiempo (h)	Conc. (ppm)	Stickiness.	Puentes Anafásicos	Cromos. aislados	C-mitosis	Micro- núcleos	Total de Anomalías
12	Control	-	-	-	-	-	0,0
	7	2,9	0,30	-	-	-	3,2
	10	8,6	0,41	0,20	-	-	9,21
	15	7,40	1,10	0,64	-	-	9,14
24	20	9,50	1,80	0,80	0,30	-	12,24
	Control	-	-	-	-	-	0,0
	7	4,90	0,80	-	-	-	5,7
	10	11,30	1,90	-	1,30	-	14,5
48	15	14,80	1,60	0,78	2,80	0,2	18,98
	20	17,10	2,50	1,20	3,20	0,1	23,1
	Control	0,2	-	-	-	-	0,2
	7	12,60	1,40	0,50	-	0,3	14,5
72	10	22,50	2,20	1,30	3,10	3,7	29,1
	15	28,30	2,80	2,40	4,80	6,2	38,3
	20	31,40	3,10	4,20	4,90	8,3	43,6
	Control	0,4	-	-	-	-	0,4
	7	19,80	1,90	4,30	-	7,1	26,0
	10	31,70	2,90	7,30	3,90	20,5	45,8
	15	33,31	3,40	9,80	2,20	23,2	48,71
	20	-	-	-	-	-	0,0

Cuadro 6. Comparación del efecto del Cd⁺² sobre el Índice Mitótico (IM) y % de Aberraciones (AB) a una misma concentración (10 ppm) y diferentes tiempos de exposición.

Tiempo (h)	% IM (X ± DS)	% AB (X ± DS)
Control	11,8 ± 1,9	0,00
12	*8,72 ± 1,75	*9,21 ± 0,30
24	**4,07 ± 1,84	**14,50 ± 1,10
48	**2,43 ± 1,60	**29,10 ± 1,83
72	**1,97 ± 1,68	**45,80 ± 3,18

Prueba múltiple de Duncan: *P < 0,05; **P < 0,01

dispensable para la formación del huso mitótico, por lo que, competitivamente, al superar la concentración de cadmio a las del calcio intracelular, se produce el bloqueo en la migración de los cromosomas metafásicos (efecto C-mitótico), independientemente del tiempo de exposición.

En general, éste análisis estadístico corrobora los resultados obtenidos sobre el efecto del Cd⁺² sobre la longitud y el IM, por lo que, se puede establecer que el efecto del tiempo es más drástico que el de la concentración utilizada. Resultados similares se han reportado en diferentes cultivos celulares (16, 24) y con otros metales

(4, 6).

Interacción entre las diferentes aberraciones cromosómicas. El mismo análisis de Duncan se realizó para determinar la correlación entre las diferentes anomalías cromosómicas inducidas por el cadmio, los resultados muestran una correlación positiva altamente significativa entre la stickiness y la formación de puentes anafásicos (r=0,883; P<0,01; n = 19), lo cual corrobora que esta última aberración es el resultado del fenómeno de stickiness que inducen a los cromosomas a permanecer unidos y en el caso de que logren separarse dan lugar a la ruptura de los cromosomas y/o a la

Cuadro 7. Comparación del efecto del Cd⁺² sobre el índice mitótico (IM) y % de aberraciones (AB) a un mismo tiempo (24 h) y diferentes concentraciones de cadmio.

Concentración	% IM(X ± DS)	% AB (X ± DS)
Control	12,01 ± 2,10	0,00
7	**8,88 ± 1,75	4,7 ± 1,80
10	**4,07 ± 1,56	**14,5 ± 4,70
15	**3,80 ± 1,39	**19,9 ± 5,09
20	**2,62 ± 1,51	**24,4 ± 6,10

Prueba múltiple de Duncan: *P < 0,05; **P < 0,01

Cuadro 8. Coeficiente de correlación (r), nivel de significancia (P) y coeficiente de determinación (R²) al relacionar aberraciones cromosómicas (AB) versus concentración de cadmio a diferentes tiempos.

AB	r	P	R ²	Observación
Stickinesis	0,169	> 0,05	2,80	Correlación no significativa
C- Mitosis	9,48	> 0,05	0,01	Correlación no significativa
Puentes Anafásicos	0,473	< 0,05	22,38	Correlación significativa
Rupturas Cromosómicas	0,054	> 0,05	0,29	Correlación no significativa

Cuadro 9. Coeficiente de correlación (r), nivel de significancia (P) y coeficiente de determinación (R²) al relacionar Aberraciones Cromosómicas (AB) versus tiempo.

AB	r	P	R ²	Observación
Stickinesis	0,628	< 0,01	39,45	Correlación altamente significativa
C- Mitosis	0,512	> 0,05	26,83	Correlación no significativa
Puentes Anafásicos	0,713	< 0,01	50,91	Correlación altamente significativa
Rupturas Cromosómicas	0,792	< 0,01	62,86	Correlación altamente significativa

formación de cromosomas aislados.

Lo expuesto queda corroborado al hacer el análisis de correlación entre la stickiness y ruptura cromosómica

($r = 0,8057$; $P < 0,05$; $n = 8$), resultando en una correlación positiva significativa entre las dos variables.

Conclusiones

El análisis de los resultados muestra un evidente efecto tóxico del cadmio sobre el crecimiento, índice mitótico e inducción de aberraciones cromosómicas en las células meristemáticas de *Allium cepa*, lo que demostró el grado de sensibilidad de esta especie a la contaminación por cadmio, representando un factor de riesgo para la salud humana, el consumo de este vegetal cultivado en regiones que presenta un alto nivel ambiental del metal. El grado de toxicidad señala una evidente correlación positiva con el tiempo y la

concentración, siendo más drástico el efecto del tiempo de exposición. También se puso de manifiesto la relación entre los diferentes tipos de aberraciones, lo cual demostró la interrelación entre ellas, por lo que se puede establecer que, cualquier tipo de anomalía cromosómica que se presente en los casos de estudios de contaminación ambiental, puede ser tomada como indicador de genotoxicidad. En el caso específico para esta especie, se puede sugerir como un buen modelo para los estudios de contaminación por metales pesados.

Agradecimiento

Los autores expresan su agradecimiento a la División de Investigación de la Facultad Experimental de Ciencias y al Consejo de

Desarrollo Científico y Humanístico (CONDES) de La Universidad del Zulia por el financiamiento parcial de este trabajo.

Literatura citada

1. Allison, K., E. Cerny, D. Smith, A. Wagh and M. Bhattacharyya. 1996. Effects of Cadmio on osteoclast formation and activity *in vitro*. *Toxicol Appl Pharm* 140:451-460.
2. Bako, G., E. Smith, J., Hanson, R. Dewar. 1982. The geographical distribution of high cadmium concentration in the environment and prostate cancer. *Can. J. Public Health*. 73:92-96.
3. Beijet, K. V. 1986. Jerneliov. Source, transport and transformation of metals in environment. In *Handbook on toxicology of metal*. Frebeg, G. F; Nurdbrg and U. B. Vouk (Eds.). Elsevier, New York. Pp 68-84.
4. Chakravarty, B., S. Srivastava. 1992. Toxicity of some heavy metals *in vivo* and *in vitro* in amsira. *Mutator. Res*. 283:287-294.
5. Deaven, L. and E. Cambell. 1980. Factors affecting the induction of chromosomal aberrations by cadmium in Chinese hamster. *Cytogenet. Cell. Genet.* 26:251-260.
6. Fiskesjo, G. 1985. The *Allium* test as a standard in environmental monitoring. *Hereditas*. 102:99-112.

7. Fox, M.R.S. 1987. Assessment of cadmium, lead and vanadium status of large animals as related to the human food chain. *J. Anim. Sci.* 65: 1744-1752.
8. Geeta, CH., S. Jaswant and T. Viswana. 1990. Effect of pH and temperature on the uptake of cadmium by *Lemna minor*. *Environ Contam Toxicol.* 47:84-90.
9. Ghazaly, K.S.. 1992. Hematological and physiological response to sublethal concentrations of cadmium in a freshwater teleost, *Tilapia zillii*. *Water, Air and Soil Pollu.* 64: 551-559.
10. Goyer, A., G. Cherian, and Delaquerriere-Richardson. 1984. Correlation of parameters of cadmium exposure with onset of cadmium - induce nephropathy in rats. *J E P T O.* 5: 89-100.
11. Hamada, T., T. Sasaguri, A. Tanimoto, N. Arima, S. Shimajiri, T. Abe, Y. Sasaguri. 1996. Apoptosis of human kidney 293 cells is promoted by Polymerized cadmium-Metallothionein. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 219: 829-834.
12. Koizumi, T., T. Yokota, T. Suzuki. 1994. Mechanism of cadmium-induce cytotoxic in rat hepatocytes. *Biological Trace Element. Research.* 42:31-41.
13. LI, M.X.. 1982. Introducing a good stain used for nucleic and chromosome. *Bull Biol.* 5:53.
14. Liu, D.H, W.S. Jiang., and M.X LI. 1992. Effects of cadmium on root growth and cell division of *Allium cepa*. *Acta Sci. Circumstantiae.* 12:339-406.
15. Lorenz, H. 1979. Binding forms of toxic heavy metals, mechanisms of entrance of heavy metals into the food chain, and possible measures to reduce levels in foodstuff. *Ecotoxic. Environ. Safe.* 3: 47-58.
16. Marcano, L., X. Montiel, I. Carruyo, M. Bracho, L. Atencio. 1998. Efecto mitotóxico y genotóxico del cadmio en células meristemáticas de cebolla *Allium cepa* L. *Ciencia.* 6(2):93-99.
17. Mo, W.H., and M. LI. 1992. Effects of CdCl₂ on the growth and mitosis of root tip cells in *Vicia faba*. *Chin. Bull. Bot.* 9: 30-34.
18. Rengel de Zambrano, I., R. Salas, M. Chaves, A. Gonzalez, B. Borges, E. Bonalde. 1997. Respuestas histológicas y genéticas inducidas por el cadmio en la tilapia roja (pices; Cichlidae, *Oreochromis* sp). *Ciencias.* 5(3) :191-204.
19. Scheuhammer, M. 1987. The chronic toxicity of aluminum, cadmium, mercury and lead in birds: a review. *Environm. Pollu.* 46: 263 - 295.
20. Sherlock, J.C.. 1984. Cadmium in foods and the diet. *Experientia* 40:152-156.
21. Slemenda, C. W., S.L. Hui, C. Longscope, and C. Johnson 1989. Cigarette smoking, obesity and bone mass. *J. Bone Miner. Res.* 4 : 737 - 741.
22. Tijo, J., A. Levan. 1950. The use of Oxiquinoline in chromosome analysis. *Analysis. Ann. Estac. Exptl. Aula Dei.* 2:21-64.
23. Yamamoto, C., T. Kaji, M. Sakamoto, and H. Kosuca. 1996. Effects of cadmium on the release of tissue plasminogen activator and plasminogen activator inhibitor type 1 from cultured human vascular smooth muscle cells and fibroblasts. *Toxicology.* 106 :179-185.
24. Zhang, Y., and X. Yang. 1994. The toxic effects of cadmium on cell division and chromosomal morphology of *Hordeum vulgare*. *Mutation Res.* 312:121-126.