

141
29^o



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

**ESTUDIOS CARIOLÓGICOS EN EL GÉNERO
MARATHRUM HUMB. & BONPL. (PODOSTEMACEAE)
EN MÉXICO.**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

B I O L O G A

P R E S E N T A

NORMA OROPEZA HERNANDEZ

Director de Tesis: Dr. Alejandro Novelo Retana

Coodractor de Tesis: Br. Pedro Mercado Ruaro



MEXICO, D. F.

**FACULTAD DE CIENCIAS
SECCION ESCOLAR**

1996

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**



Universidad Nacional
Autónoma de México



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.



UNIVERSIDAD NACIONAL
AVENIDA DE
MEXICO

M. en C. Virginia Abrín Batule
Jefe de la División de Estudios Profesionales de la
Facultad de Ciencias
Presente

Comunicamos a usted que hemos revisado el trabajo de Tesis: ESTUDIOS CARTOLOGICOS
EN EL GENERO MARATHRUM HUMB. & BONPL. (PODOSTEMACEAE) EN MEXICO.

realizado por NORMA OROPEZA HERNANDEZ

con número de cuenta 8332296-5 , pasante de la carrera de BIOLOGIA

Dicho trabajo cuenta con nuestro voto aprobatorio.

Atentamente

Director de Tesis Propietario DR. ALEJANDRO NOVELO RETANA

Propietario BIOL. PEDRO MERCADO RUARO

Propietario M. EN C. GUILLERMINA MURGUIA SANCHEZ

Suplente DRA. HILDA FLORES OLVERA

Suplente BIOL. MIGUEL ANGEL MENESES PEREZ

Consejo Departamental de Biología

A MIS PADRES:
MANUEL OROPEZA Y MARCELINA HERNÁNDEZ
POR SU CONSTANTE APOYO Y ESTIMULO
PARA SEGUIR ADELANTE, POR TODO
EL AMOR BRINDADO A SU FAMILIA
Y POR MANTENERLA UNIDA.
GRACIAS POR LOS MOMENTOS QUE HEMOS PASADO JUNTOS.

A MIS HERMANOS:
SERGIO, VICTOR, JAIME,
PATY Y MARY PAZ,
POR SU GRAN APOYO Y NUESTRA AMISTAD.

CONTENIDO

AGRADECIMIENTOS	I
RESUMEN	II
INTRODUCCIÓN	1
ANTECEDENTES	2
CITOGENÉTICA	2
MITOSIS	2
Cariotipo e idiograma	3
Mutaciones	5
Evolución del cariotipo	7
MEIOSIS	8
GENERALIDADES DE LA FAMILIA PODOSTEMACEAE	9
Habitat y ecología	11
Importancia	12
Distribución y taxonomía del género <i>Marathrum</i>	13
ESTUDIOS CROMOSOMICOS DE LA FAMILIA PODOSTEMACEAE	15
OBJETIVOS	19
MATERIALES Y MÉTODOS	19
Colecta y separación del material	19
MITOSIS	20
Germinación de semillas	20
1) En cajas de petri	20
2) En acuario	20
Técnica para mitosis	21
MEIOSIS	22
Técnica para meiosis	22
Elaboración de los cariotipos	23
RESULTADOS	28
DISCUSIÓN	43
CONCLUSIONES	48
BIBLIOGRAFÍA	49

CONTENIDO

AGRADECIMIENTOS	I
RESUMEN	II
INTRODUCCIÓN	1
ANTECEDENTES	2
CITOGENÉTICA	2
MITOSIS	2
Cariotipo e Idiograma	3
Mutaciones	5
Evolución del cariotipo	7
MEIOSIS	8
GENERALIDADES DE LA FAMILIA PODOSTEMACEAE	9
Habitat y ecología	11
Importancia	12
Distribución y taxonomía del género <i>Marathrum</i>	13
ESTUDIOS CROMOSOMICOS DE LA FAMILIA PODOSTEMACEAE	15
OBJETIVOS	19
MATERIALES Y MÉTODOS	19
Colecta y separación del material	19
MITOSIS	20
Germinación de semillas	20
1) En cajas de petri	20
2) En acuario	20
Técnica para mitosis	21
MEIOSIS	22
Técnica para meiosis	22
Elaboración de los cariotipos	23
RESULTADOS	28
DISCUSIÓN	43
CONCLUSIONES	48
BIBLIOGRAFÍA	49

AGRADECIMIENTOS

A mis padres Manuel Oropeza y Marcelina Hernández, por el apoyo que siempre me han proporcionado, por la paciencia y el trabajo que han dedicado en la realización de nuestras metas.

Esta tesis se realizó gracias a las facilidades proporcionadas por el Laboratorio de Citogenética del Instituto de Biología de la UNAM y el financiamiento otorgado por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) clave: 1753N como parte del proyecto "Estudios sistemáticos y evolutivos de las Podostemaceas mexicanas: un proyecto conjunto de investigación", llevado a cabo por el Dr. Alejandro Novelo Retana y el Dr. Thomas Philbrick.

Quiero manifestar mi agradecimiento al Dr. Alejandro Novelo Retana por dirigir esta tesis, por su apoyo y constante asesoría en la realización de este trabajo, así como por su amistad e interés en mi desempeño académico.

Al Biól. Pedro Mercado Ruaro por la coodirección de tesis, por su asesoría en el trabajo de laboratorio y por sus valiosas sugerencias.

A la M. en C. Guillermina Murguía por la revisión y sus acertadas sugerencias.

A los demás miembros del jurado: Dr. Hilda Flores Olvera, Biól. Miguel Angel Meneses Pérez por sus valiosas aportaciones durante la revisión de este manuscrito.

A la Biól. Susana Gama por enseñarme la técnica de mitosis y por su apoyo al inicio de este trabajo.
A la M. en C. Ana Rosa Flores Márquez por la revisión del manuscrito.

Deseo hacer patente mi agradecimiento al Biól. Leandro Ramos Ventura por la asesoría constante en el trabajo de computo durante la realización de esta tesis, por la elaboración de los mapas, por su compañerismo y su amistad. También agradezco al Biól. Alfredo Wong por su apoyo en la parte de computo, elaboración de figuras y diapositivas.

A la Biól. Adelaida Ocampo Flores del Banco de Semillas por la asesoría proporcionada en la germinación de semillas y por facilitarme sus instalaciones.

Al grupo de colecta: Dr. Alejandro Novelo Retana, Dr. Thomas Philbrick, Dr. Crow, por sus valiosas enseñanzas de botánica en el campo, así como por su apoyo en la realización de este trabajo.

A Felipe Villegas por la elaboración de figuras.

A Ivonne, Sara, Laura, Eloisa, Paty, Alberto y Antonio por su compañerismo y los gratos momentos que pasamos juntos.

En especial a mis hermanas y amigas Paty y Mary Paz.

RESUMEN

El género *Marathrum*, se distribuye desde México hasta centroamérica, norte de Sudamérica y las Antillas. En México se han reportado las siguientes 6 especies: *M. elegans* Royen, *M. haenkeanum* Engl., *M. rubrum* Novelo y Philbrick, *M. tenue* Liebmann, *M. trichophorum* Royen y *M. schiedeanum* Cham.

En este trabajo se realizó un estudio cariológico en el género *Marathrum*, con la finalidad de aportar información que contribuya a la sistemática de la familia Podostemaceae.

Se utilizaron semillas de cinco especies del género *Marathrum*, las cuales fueron colectadas en el campo para la técnica de mitosis, y botones florales fijados en el momento de la colecta para la técnica de meiosis. La germinación de semillas se llevó a cabo por dos métodos diferentes; En cajas de petri y en un acuario.

El método que proporcionó resultados positivos para la germinación de semillas y de crecimiento de meristemos apicales activos; es utilizando un acuario con condiciones controladas de fotoperíodo, temperatura, pH, oxigenación y de concentración de nutrientes.

Se determinó el número cromosómico diploide $2n=28$ para las poblaciones de las siguientes especies; *M. elegans*, *M. haenkeanum*, *M. rubrum* y *M. tenue*. Se sugiere que el número básico para el género *Marathrum* en México es $x=14$. Sólo fue posible determinar el número cromosómico haploide para *M. haenkeanum* con $n=14$.

Se hicieron estudios de las características cromosómicas analizadas de las fotografías tomadas para cada especie, se observaron diferencias en la longitud total de la cromatina y presentaron los siguientes valores; 35.3, 34.5, 32.51 y 40.61 μm para *M. haenkeanum*, *M. rubrum*, *M. elegans* y *M. tenue* respectivamente.

De acuerdo al análisis cariotípico, *M. rubrum* se considera cariotípicamente más primitivo que *M. haenkeanum*; ya que *M. rubrum* presentó mayor número de cromosomas metacéntricos y por lo tanto un cariotipo más simétrico. El cariotipo de *M. haenkeanum* se ha modificado probablemente por inversiones pericéntricas y translocaciones homocigóticas desiguales.

INTRODUCCIÓN

Debido a su situación geográfica en el continente americano, en la República Mexicana se concentra una gran diversidad de especies vegetales, que representan casi todos los grandes biomas que se han descrito en el mundo (Rzedowski, 1991). El alto porcentaje de endemismos, cercano al 10% en el caso de los géneros y 52% en el caso de las especies, de las 220 familias, 2400 géneros y 22000 especies conocidas de la Flora Fanerogámica son, en gran parte, los exponentes de la riqueza florística del país (Rzedowski, 1991).

Dentro de esta flora, las plantas acuáticas son parte importante de los cuerpos de agua (Bonilla-Barbosa y Novelo, 1995). La flora vascular acuática de México está representada por 84 familias, 258 géneros y 747 especies (Lot et al., 1993). De las angiospermas acuáticas, la familia Podostemaceae es la más diversa, representada en el mundo por aproximadamente 270 especies en 48 géneros (Cook, 1990; Philbrick y Novelo, 1993; Royen, 1951).

Royen (1951) realizó la revisión taxonómica de la familia Podostemaceae en el Nuevo Mundo y propuso las subfamilias Podostemoideae y Tristichoideae, compuesta cada una por dos tribus. Willis (1914) y posteriormente Cusset y Cusset (1988) propusieron elevar a la subfamilia Tristichoideae a nivel de familia. Los estudios taxonómicos de esta familia muchas veces se han visto obstaculizados por la presencia de un alto grado de polimorfismo y material insuficiente para la realización de las clasificaciones y a lo complicado de su colecta debido al tipo de habitat en el que se encuentran (Philbrick y Novelo, 1995; Royen, 1951).

Los trabajos taxonómicos en la familia Podostemaceae se basan principalmente en estudios morfológicos y anatómicos, y en menor grado incluyen estudios embriológicos, palinológicos, fitoquímicos y citogenéticos.

Los estudios citogenéticos determinan la variación genética y sus causas, información que es fundamental para conocer que tan plásticos son los genotipos entre y dentro de las diferentes porciones de un rango ecológico, tomando en consideración el sistema reproductivo, ciclo de vida y grado de intercambio genético en las poblaciones (Kenton, 1986). Los análisis citogenéticos, de acuerdo con Stebbins (1971), pueden contribuir al entendimiento de las relaciones sistemáticas dentro de un grupo de plantas (de nivel taxonómico mayor) y permitir una reorganización del sistema taxonómico del grupo en cuestión.

El campo de la citogenética clásica comprende básicamente el análisis del comportamiento de los cromosomas durante la mitosis y la meiosis.

El género *Marathrum*, es el mejor representado de la familia Podostemaceae en México, debido a que cuenta con el 20% de las especies descritas para América. El conocimiento taxonómico del género *Marathrum* es confuso, ya que existen problemas de delimitación a nivel genérico (Royen, 1951). La finalidad del presente trabajo es determinar el número cromosómico de las especies mexicanas, empleando técnicas citogenéticas que permitan el análisis de las características morfológicas de los cromosomas tanto en células somáticas como en células gaméticas, como una aportación a la sistemática de las Podostemaceae.

ANTECEDENTES

CITOGÉNICA

La citogenética es la ciencia que estudia la correlación de las características genéticas y citológicas de los organismos. Su desarrollo comienza a partir de la teoría cromosómica planteada por Sutton y Boveri (1903), la cual afirma que los cromosomas son los portadores de la información genética, base material de la herencia (Moore, 1979; Sáez y Cardoso, 1978). Comprende esencialmente el estudio de la regularidad de la distribución de los genes de célula a célula (mitosis), de generación en generación (meiosis), así como su origen y la relación con la transmisión y la recombinación génica (García, 1988; Sáez y Cardoso, 1978). El desarrollo de esta ciencia, impulsó de forma importante el inicio de los estudios citogenéticos como una herramienta útil en la exploración de los recursos genéticos vegetales (Palomino, 1986).

MITOSIS

Los cromosomas son entidades permanentes del núcleo celular, su aspecto depende del estado fisiológico en que se encuentre la célula, pueden estar en forma de delgados filamentos como se presentan en interfase nuclear o bien como elementos de forma y tamaño característicos en las fases finales de la división celular (Sáez y Cardoso, 1978).

Los cromosomas mitóticos son observados en células somáticas obtenidas de tejido meristemático, las cuales son sometidas a tratamientos de diversos mitostáticos, previos a la fijación y tinción (García, 1988; Mercado y Lira, 1994). Con esta técnica se obtiene el número cromosómico somático ($2n$) de una planta o un grupo de plantas relacionadas, la estructura de los cromosomas o cariotipos, así como los niveles de poliploidía (Palomino, 1995). Con esta información se determina el número básico (x) de grupos de ligamiento génico y cuántas veces se repiten, proporcionando un indicador rápido de la similitud génica entre poblaciones y especies (Kenton, 1986).

Cariotipo e idiograma

El cariotipo es la apariencia fenotípica del complemento cromosómico particular de un individuo o grupo afín de individuos y está definido tanto por el número como por la forma de los cromosomas en metafase mitótica (John, 1976; Lewistky, 1931; Stebbins, 1971).

Los cariotipos se definen con respecto a seis características cromosómicas: a) número básico (x), b) tamaño absoluto, c) tamaño relativo, d) relación de brazos, e) número y tamaño de constricciones secundarias, f) distribución y tamaño de segmentos hetero y eucromáticos.

a) Número básico. Representa el número monoploide más pequeño de cromosomas de una serie poliploide (Rieger et al., 1982). Es una de las características mejor conocidas y la más utilizada en la determinación de la posición taxonómica y filogenética de las especies. Géneros, especies e incluso familias relacionadas, poseen a menudo números cromosómicos del mismo orden de magnitud (Morán, 1949; White, 1957).

b) Tamaño absoluto. Se refiere a la longitud y al diámetro (expresado en micrómetros) del total y de cada uno de los cromosomas. La longitud individual de los cromosomas metafásicos puede variar desde menos de un micrómetro hasta más de treinta. Sin embargo, los tamaños más frecuentes son entre 3 y 5 micrómetros (Swason et al., 1968).

c) Tamaño relativo. Es la relación que guarda la longitud de un cromosoma particular con respecto a los demás y al total del genoma. Esta es una característica constante y permite la identificación y clasificación del complejo cromosómico. Los distintos pares de cromosomas se arreglan en orden decreciente

de tamaño y se numeran progresivamente, partiendo de uno para el par más largo (García, 1988). Esta relación puede ser estimada como el porcentaje con respecto a la longitud total del genomio tomado como 100%. Esto permite visualizar más claramente las diferencias o similitudes entre los cromosomas de genomios o especies diferentes.

d) Relación de brazos. La morfología cromosómica es determinada por la posición del centrómero (García, 1988).

La posición del centrómero (también llamada constricción primaria) se caracteriza por su gran constancia y constituye un marcador útil en la identificación morfológica de los cromosomas. El centrómero separa al cromosoma en dos regiones o brazos y su localización puede ser expresada en términos de relación de brazos, que se estima mediante la división de longitud del brazo largo entre la del brazo corto. De acuerdo a la posición del centrómero, Levan et al. (1964) clasifican a los cromosomas en cuatro grupos: m (metacéntricos), sm (submetacéntricos), st (subtelocéntricos) y t (telocéntricos). Cada uno de estos grupos se caracteriza por una magnitud definida de su relación de brazos.

e) Constricciones secundarias. Es otra característica utilizada en el análisis cariotípico, en particular para marcar ciertos cromosomas. Son estrechamientos constantes en su posición y tamaño (cortas o largas) en algunos casos están estrechamente relacionados con el lugar en que se encuentra el organizador nucleolar. La región organizadora nucleolar (NOR) está constituida por un conjunto de copias de genes que codifican para el ARN ribosómico (ARNr).

El número de cromosomas que presentan constricciones secundarias de cada célula varía de una especie a otra; la presencia de por lo menos uno, garantiza que se produzca la síntesis protéica, ya que su función es la síntesis del ARN de los ribosomas que se encargan de realizar la lectura de los ARN mensajeros durante el proceso de traducción.

Un segmento cromosómico separado del cuerpo principal del cromosoma mediante una constricción secundaria, se denomina satélite y puede ser terminal o intercalar.

f) Heterocromatina y eucromatina. El término heterocromatina se utiliza para describir ciertas regiones del cromosoma que tienen una estructura densa y se colorean intensamente con la tinción durante la interfase del ciclo celular, mientras que el término eucromatina se emplea para designar segmentos

restantes del cromosoma que pierden gran parte de su identidad visual durante la interfase. Dicha característica se debe al grado de empaquetamiento de la cromatina y determina la actividad genética. La heterocromatina densamente empaquetada no puede ser transcrita ("inactiva" genéticamente), la eucromatina más o menos desenrollada se halla disponible para la síntesis de proteínas (Jackson, 1971).

Se distinguen dos tipos de heterocromatina: la constitutiva, presente en posición idéntica en cada uno de los cromosomas homólogos, es de carácter estructural y responde de la misma manera durante todo el proceso de desarrollo. La facultativa, existe diferencia en el comportamiento de los cromosomas homólogos durante el desarrollo, uno puede ser en parte o completamente heterocromático y el otro puede permanecer eucromático (Jackson, 1971).

Mutaciones

El material genético es constante, proporciona la estabilidad genética y la continuidad de los organismos y de las poblaciones (Moore, 1979). La constancia del material genético en el proceso de transcripción de la información hereditaria, puede verse alterado por cambios en la estructura y disposición de los segmentos cromosómicos, a los que se les denomina mutaciones. La proporción de mutaciones cromosómicas o génicas en forma espontánea es relativamente baja (Rieger et al., 1982; Sáez y Cardoso, 1978).

Las mutaciones pueden ser de tres tipos:

1. Mutaciones puntuales. Son aquellas que implican sólo el cambio de uno o varios nucleótidos o de una base en un gen, ya sea por sustitución, adición o eliminación (Robertis y Robertis, 1990).

2. Mutaciones o cambios estructurales. Son aquellas que implican una alteración y un reordenamiento de los genes en los cromosomas, pueden ocurrir en un solo cromosoma (intracromosómicas) como la delección, duplicación o inversión de segmentos cromosómicos, o en dos o más cromosomas (intercromosómicas), como las translocaciones y fisiones centroméricas (Sáez y Cardoso, 1978).

Delección: consiste en la pérdida de un segmento de material cromosómico, si es terminal se llama deficiencia y cuando es intersticial (entre el centrómero y el telómero) se llama delección (Robertis y Robertis, 1990).

Duplicación: ocurre cuando un segmento del cromosoma está representado dos o más veces, puede ser intercromosómica o intracromosómica; en la primera el segmento duplicado se localiza en un cromosoma no homólogo, en el segundo los segmentos duplicados están contenidos en el mismo cromosoma, pueden estar contiguos, a lo que se llama duplicaciones en "tandem" o intercalados a lo largo del cromosoma (Sáez y Cardoso, 1978).

Inversión: se da un reordenamiento del material cromosómico por una rotación de 180 grados de un segmento. Son pericéntricas cuando el segmento incluye al centrómero y paracéntricas en el caso contrario (Rieger et al., 1982).

Translocación: cambio de posición de los segmentos cromosómicos (y de las secuencias génicas que contienen), dentro del complemento cromosómico. Al intercambio de segmentos entre cromosomas homólogos o no homólogos se llama translocación recíproca, puede ser igual o desigual y a la transferencia de un segmento cromosómico a un lugar distinto del mismo cromosoma o de otro cromosoma se la llama translocación simple (Rieger et al, 1982; Sáez y Cardoso, 1978).

3. Cambios numéricos. Son alteraciones en el número de cromosomas, las cuales son el resultado de fisiones centroméricas, fusiones céntricas, aneuploidía y poliploidía.

a) Fisiones centroméricas. Producen cambios en la estructura de los cromosomas. La división transversal del centrómero de un cromosoma metacéntrico origina un par de cromosomas telocéntricos, causando un cambio morfológico o de relación de brazos del cromosoma, lo que implica un cambio en el número total de cromosomas (Jones, 1978).

b) Las fusiones céntricas. Son aquellas que resultan de la unión de dos cromosomas acro- o telocéntricos para formar un cromosoma metacéntrico. Este cambio produce una reducción del número total de cromosomas, pero al igual que en las fisiones, se mantiene constante el número fundamental (N.F.) que es definido como la cantidad de brazos largos en cada cromosoma, siendo dos para los cromosomas metacéntricos y submetacéntricos y uno para los cromosomas acrocéntricos y telocéntricos (Jones, 1978; Robertis y Robertis, 1990).

c) Aneuploidía. Se produce por una falla en la segregación de los cromosomas (no disyunción) en meiosis o en mitosis, dándose una ganancia o pérdida de uno o más cromosomas (Robertis y Robertis, 1990).

d) **Poliploidía.** Involucra duplicación de todo el complemento cromosómico, ya sea por la supresión de la citocinesis, o bien por la formación de gametos con un número no reducido de cromosomas. Esta puede ser de dos tipos:

i) **Autopoliploidía.** La presencia de más de dos de los complementos cromosómicos monoploides de la misma especie (Swason et al., 1968).

ii) **Alopoliploidía.** Cuando el aumento del número cromosómico se da con la formación de un híbrido, es decir, la unión de genomas de dos o más especies distintas, con posterior duplicación de los mismos (Sáez y Cardoso, 1978).

Evolución del cariotipo

El análisis citogenético ha permitido a los taxónomos, evolucionistas, citogenetistas, biólogos moleculares y fitomejoradores avanzar en el estudio sobre el grado de relación entre los taxa y sus patrones de divergencia (Kenton, 1986; Singh, 1993). Dicho análisis se basa en el conocimiento del número cromosómico, posición del centrómero, longitud total, número y posición de constricciones secundarias (Kenton, 1986; Jackson, 1971; Stebbins, 1971). El estudio comparativo de los cariotipos muestra las diferencias cromosómicas entre especies, da indicios de cómo surgieron estas diferencias en el curso de la evolución y apoya las teorías de las relaciones filogenéticas de los organismos (García, 1988; Stebbins, 1971).

Lewitzky (cit. por Stebbins, 1971) propuso por primera vez los términos simetría - asimetría, asociados al tipo de cromosoma que constituyen un complemento cromosómico específico. Considera un cariotipo simétrico cuando poseen un mayor número de cromosomas metacéntricos y submetacéntricos. El incremento de la asimetría de un cariotipo puede ocurrir por cambio de posición del centrómero, de central a subterminal o terminal, o bien mediante la acumulación de diferencias en el tamaño relativo entre cromosomas por translocaciones no recíprocas originando un cariotipo más heterogéneo.

Lo anterior se basa en los estudios realizados por Lewitzky (1931) en la subfamilia Helleboreae (*Ranunculaceae*), él menciona que los individuos morfológicamente más primitivos, presentan cariotipos más simétricos, mientras que los individuos más avanzados presentan cariotipos más asimétricos. También indica que en las angiospermas existe la tendencia hacia el incremento de la asimetría de los cariotipos, como se observó en *Aster* y *Haplopappus* (Stebbins, 1971).

El incremento de la asimetría de los cariotipos puede ser el resultado de inversiones pericéntricas y translocaciones desiguales de los segmentos de los brazos cromosómicos, sin afectar el número de centrómeros o de cromosomas del complemento. Sin embargo, las inversiones pericéntricas que originan cromosomas acrocéntricos a partir de metacéntricos pueden reducir el número fundamental del complemento (Stebbins, 1971).

Jones (1978) propone que la tendencia a la asimetría en la evolución cariotípica de los grupos de plantas puede ser reversible, debido a cambios causados por translocaciones desiguales, inversiones, deleciones, fusiones, fisiones o duplicaciones en segmentos cromosómicos, dando origen a cromosomas acro- o telocéntricos inestables, que podrían fusionarse y formar metacéntricos. Entonces se produciría un proceso que puede continuar durante el período evolutivo con ciclos de simetría y asimetría, una vez que estos ciclos se hayan alcanzado totalmente.

Por otro lado, la poliploidía y la formación de descendencia híbrida han sido factores cromosómicos importantes dentro de la evolución de las angiospermas (Gardner et al., 1991; Moore, 1979; Rieger et al., 1982). Es posible inducir la poliploidía empleando sustancias como la colchicina, acenafeno, etc., las cuales inhiben la formación del huso e interfieren en la división celular. Desde los puntos de vista teórico y práctico, son muchas las posibilidades que ofrece la producción experimental de poliploides (Gardner et al., 1991; Robertis y Robertis et al., 1990).

MEIOSIS

Los cromosomas meióticos son comúnmente observados en las células madres del polen (CMP) contenidas en las anteras de las flores jóvenes; la técnica consiste en el maceramiento de anteras, tinción con acetorceína y observación en fresco al microscopio de luz (García, 1988; Palomino, 1986). El análisis de los cromosomas meióticos, así como el comportamiento de los mismos, permite conocer el número y complemento haploide (n) de una especie en particular, colaborando al establecimiento del número básico de un grupo de plantas (Palomino, 1986).

En la meiosis se analiza el número y posición de los quiasmas que mantienen unidas a las cromátidas en fase de diploteno hasta la metafase I, detectando la formación de univalentes, bivalentes, tetravalentes o polivalentes. Esta información puede indicar el origen de alloploides, autopolloides, cambios Robertsonianos o rearrreglos cromosómicos que afectan el comportamiento reproductivo y el patrón de

variación de las poblaciones, así como los eventos que se han llevado a cabo en la evolución del cariotipo y las relaciones evolutivas en el nivel genómico (García, 1985; Palomino, 1986).

Stace (1980) señala que la información taxonómica más usual es el conteo cromosómico y es la evidencia biosistemática que más se utiliza en las floras modernas. No obstante la importancia que representa la determinación del número cromosómico, esta información sólo se conoce para 15 al 20% de las plantas vasculares y esta cifra puede ser menor para familias tropicales.

De acuerdo con Singh (1993), la nomenclatura y las relaciones de las especies basada en la taxonomía clásica puede ser verificada por evidencias citogenéticas, como son: el análisis cariotípico, grado de entrecruzamiento, viabilidad de híbridos, comportamiento en meiosis, procedimientos bioquímicos y caracterización molecular. Sin embargo, las relaciones filogenéticas entre especies y su clasificación pueden ser mejor entendidas utilizando diferentes disciplinas como la morfología, anatomía, palinología, citogenética, bioquímica, etc. (Singh, 1993; Stace, 1980).

GENERALIDADES DE LA FAMILIA PODOSTEMACEAE

Podostemaceae es la única familia americana de angiospermas acuáticas, representada por especies que crecen adheridas a un sustrato rocoso, en ríos de fuerte corriente y pequeñas cascadas. Aunque este tipo de hábitat lo comparte con Hydrostachyaceae, esta última es una familia africana monogénica con cerca de 22 especies. La distribución de las Podostemaceae comprende principalmente regiones tropicales desde el noreste de América hasta Sudamérica, África tropical, este de Asia y Australia, y muy pocas especies alcanzan las zonas templadas (Cook, 1990).

Las Podostemaceae son un grupo de hierbas acuáticas altamente variables en forma y tamaño, las pequeñas a menudo son taloides y las grandes poseen tallos bien diferenciados, simples o ramificados. Tiene hojas dísticas, trísticas o reducidas, estipuladas o exestipuladas. Las flores son bisexuales, solitarias o se encuentran en inflorescencias cimosas, pediceladas, actinomorfas o zigomorfas; presentan un perianto de 2 a muchos lóbulos, libres o adnados o con tépalos muy reducidos; estambres de 1 a muchos, alternos con los tépalos; ovario 1-3 locular, carpelos lisos, acostillados o alados, óvulos numerosos. Fruto capsular 1-3 locular, semillas 2 a numerosas (Royen, 1951, 1954).

Se ha calculado que las Podostemaceae son las plantas acuáticas estrictas más diversas, con 31 géneros y cerca de 175 especies que otras familias de plantas acuáticas (Philbrick y Novelo, 1995). En el Viejo Mundo se presenta un mayor número de géneros, mientras que en América hay más diversidad de especies (aproximadamente un 60%). De los 19 géneros y 161 especies presentes en el continente americano, alrededor del 70% de las especies se ubican en 4 géneros: *Apinagia* con aproximadamente 50 especies, *Marathrum* con 25, *Rhyncholacis* con 25 y *Podostemum* con 10 (Philbrick y Novelo, 1995).

En México, la familia Podostemaceae está conformada por 5 géneros y 11 especies; *Marathrum* Humb. y Bonpl., *Oserya* Tul., *Podostemum* Michaux, *Tristicha* Du Petit Tohuars y un género recientemente descubierto para México *Vanroyenella* Novelo y Philbrick (Philbrick y Novelo, 1995). De estos géneros, *Marathrum* presenta en nuestro país hasta el momento el mayor número de especies, en el que se reportan las siguientes: *M. elegans* Royen, *M. haenkeanum* Engl., *M. rubrum* Novelo y Philbrick, *M. tenue* Liebm., *M. trichophorum* Royen y *M. shiedeanum* Cham.; *Oserya* cuenta con dos especies, *O. coulteriana* Tul. y *O. longifolia* Novelo y Philbrick; los géneros *Podostemum*, *Tristicha* y *Vanroyenella* son monoespecíficos (Novelo y Philbrick, 1993; Royen, 1954). En este trabajo ya no se incluye a *Marathrum trichophorum* citada anteriormente, por que de acuerdo a Alejandro Novelo (comunicación personal) es una especie descrita con base en un ejemplar mezclado, de hojas de *Marathrum* y frutos de *Vanroyenella plumosa*.

Richard (1815) reconoció por primera vez a la familia Podostemaceae e incluyó a los géneros *Marathrum* y *Podostemum*, colocándola dentro de las monocotiledóneas, junto a las Juncaceae, Butomaceae y Alismataceae. Lidley (1830) sugiere que las Podostemaceae deberían estar ubicadas dentro de las dicotiledóneas, considerando su hábitat, la división binaria del ovario y la venación de las hojas. Esta hipótesis es confirmada por Schleiden (1839) y Gardner (1850), quienes comprobaron que los embriones presentan dos cotiledones. Warming (1890) y otros autores la situaron dentro del orden de las Rosales. Posteriormente Hutchinson (1959) ubica a las Hydrostachyaceae y Podostemaceae en el orden Podostemales entre las Sarraceniales y Caryophyllales. Los estudios citológicos realizados por Maurizon (1933) revelaron que las Podostemaceae presentan una relación estrecha con Saxifragaceae, Crassulaceae y Rosaceae.

Posteriormente Royen (1951) propuso dividir a la familia Podostemaceae en las subfamilias Podostemoideae y Tristichoideae, cada una compuesta por dos tribus; sin embargo él no menciona a cuales familias están relacionadas las Podostemaceae. Willis (1914) y más tarde Cusset y Cusset (1988) proponen elevar la subfamilia Tristichoideae a nivel de familia.

Taxonómicamente la familia está muy aislada (Cronquist, 1981) y las Podostemaceae deberían constituir su propio orden (Podostemales). Aunque sus afinidades son inciertas, existe acuerdo en su relación con las Saxifragaceae, Crassulaceae y quizás con Hydrostachyaceae, con base a estudios fitoquímicos que realizaron Romo et al., (1993).

Hábitat y ecología

El peculiar hábitat de las Podostemaceae (llamadas comúnmente hierbas de los ríos), hace interesante su estudio. Aunque la mayoría son pantropicales, pocas especies crecen en regiones templadas. En América sólo *Podostemum ceratophyllum* Michx. alcanza el noreste de Estados Unidos y Canadá (Philbrick y Crow, 1983; Philbrick y Novelo, 1995).

Las características generales de la historia de vida de las Podostemaceae refleja la naturaleza del hábitat estacional en el cual se presentan (Novelo y Philbrick, 1993). Debido a que los niveles de agua de los ríos cambian periódicamente de un nivel alto a un nivel bajo, durante el primer período ocurre el máximo crecimiento vegetativo cuando las plantas están totalmente sumergidas en aguas bien aereadas y en áreas iluminadas con luz solar directa. Las plantas crecen adheridas directamente a sustratos sólidos (rocas y ramas) por medio de rizoides adherentes parecidos a pelos absorbentes y zarcillos carnosos expandidos llamados "haptera", el eje postrado sirve principalmente como un órgano de anclaje y parece no tener ninguna función en la absorción de nutrientes y agua (Novelo y Philbrick, 1993). La floración ocurre únicamente cuando los niveles de agua descienden y es de tipo aérea, se ha reportado polinización anemófila y entomófila (Novelo y Philbrick, 1993).

El fruto capsular de las Podostemaceae requiere desecación para la dehiscencia, dejando caer las semillas a las rocas. Su dispersión puede ser por agua en un mismo río y se cree que entre sistemas de ríos podría ser por pájaros. Una vez sobre la roca, la capa más externa de la cubierta de la semilla se expande al ser hidratada y se forma un mucilago que al secarse se adhiere firmemente al sustrato (Novelo y Philbrick, 1993; Royen, 1951).

El crecimiento vegetativo máximo de las hierbas de los ríos ocurre cuando la planta está sumergida, así las hojas más grandes se encuentran antes de la floración. Sin embargo, cuando las plantas están expuestas, comienza la floración y las hojas maduras frecuentemente se pierden. Finalmente, en el momento de la maduración de la cápsula, las hojas tienen ya mucho tiempo de haber muerto y

desaparecido. Lo anterior hace necesario visitar una población repetidamente para coleccionar todas las fases del ciclo de vida (Novelo y Philbrick, 1993).

Importancia

Las Podostemaceae no son importantes económicamente, aunque en Colombia y Panamá se ha reportado su uso como forraje durante la temporada de secas. En otros países se utilizan como comida para peces o como ensalada (Royen, 1951). En el Amazonas se utilizan ciertas especies como sazón de comida; una de éstas es *Rhyncholacis*, en la cual las hojas son secadas y pulverizadas y se usan como sustituto de la sal. En algunos lugares de México, algunas especies de *Marathrum* son empleadas como planta medicinal contra enfermedades del hígado (Philbrick y Novelo, 1995).

Cook (1990) y Royen (1951) han reportado un alto porcentaje de endemismos para la familia Podostemaceae. En el continente americano se ha calculado que llega al 48%, por ejemplo la presencia de especies en un sólo río o en un grupo de ríos; aunque la falta de colecciones adecuadas de la mayoría de las especies de esta familia impiden hacer estimaciones reales en cuanto al nivel de endemismos en los diferentes niveles taxonómicos (Philbrick y Novelo, 1995).

Philbrick y Novelo (1995) mencionan que 14 de los 19 géneros del continente americano contienen especies endémicas; algunos géneros monotípicos como *Ceratolacis*, *Devillea* y *Vanroyenella* son localmente endémicos. Los géneros *Apinagia*, *Castelnavia*, *Oserya* y *Rhyncholacis* presentan más de 50% de especies endémicas, también se conocen endemismos en *Janmaniella*, *Marathrum*, *Mourera* y *Podostemum*.

Por otro lado en los estudios realizados sobre la distribución de las especies de *Marathrum* en México por Novelo y Philbrick (1995), señalan la presencia de *M. elegans*, *M. haenkeanum*, *M. schiedeanum* y *M. rubrum* creciendo en ríos oligotróficos que fluyen de las montañas del centro de Jalisco hacia el Océano Pacífico. De estas especies, *M. haenkeanum* es más común en los sistemas de ríos de la región; sin embargo, se presenta un caso particular ya que en el río Horcones crece *M. rubrum* y en el río Veranos crece *M. haenkeanum*, pero en la confluencia de los dos ríos sólo se puede encontrar a *M. rubrum*. Factores como lo son tipo y disponibilidad de sustrato, exposición a la luz, velocidad de corriente y niveles de impacto humano son similares, así como, los niveles de elementos traza tales como el Na, K, Mg y Ca.

Aunque las causas de este comportamiento podrían ser: diferencias en la dispersión de semillas en varios ríos por factores bióticos (quizá aves) y abióticos (agua) o diferencias en las características de las semillas (tamaño y forma), no está comprobado experimentalmente si estos factores afectan su distribución

y por lo tanto, son necesarios más estudios que expliquen el alto porcentaje de endemismo en la familia Podostemaceae (Philbrick y Novelo, 1995).

El aumento de poblaciones humanas en regiones tropicales es un factor que ejerce fuerte impacto negativo sobre los ambientes acuáticos, debido a que estos son usados para diversas actividades industriales, agropecuarias y de servicios urbanos. En la actualidad se sabe que las Podostemaceae son sensibles a la contaminación del agua: poblaciones de *Podostemum ceratophyllum* en New Hampshire, Estados Unidos, declinaron por descargas industriales a principios de los 70's (Philbrick & Crow, 1983). En Veracruz, México, el establecimiento de plantaciones de café causó la desaparición de *Podostemum ricciforme* en la localidad tipo (Philbrick y Novelo, 1993). Un comportamiento similar se observó en Nayarit, México, debido al establecimiento de una planta mejoradora de café cerca del río Refilión provocando que desaparecieran poblaciones de *Marathrum haenkeanum*, *Oserya coulteriana* y *Tristicha trifaria* que anteriormente existían en abundancia (A. Novelo, comunicación personal).

La sensibilidad a la contaminación de estas plantas no se conoce de manera específica. No obstante que indicadores biológicos de esta clase podrían servir como un medio valioso a bajo costo de rápida evaluación de la calidad del agua en ríos tropicales (Novelo y Philbrick, 1993). Considerando lo anterior, es importante su estudio desde el punto de vista de su conservación.

Distribución y taxonomía del género *Marathrum*

El género *Marathrum*, se distribuye en las Antillas y desde México, hasta el norte de Sudamérica (Royer, 1951).

De las 25 especies del género *Marathrum* que viven en América, el mayor número de especies se encuentran distribuidas en Sudamérica con cerca de 20 spp. En México se encuentran sólo 6 especies (Philbrick y Novelo, 1995).

El género fue fundado por Humboldt y Bonpland en 1808 con la especie *M. foeniculaceum*.

El sistema de clasificación propuesto por Bentham y Hooker (1860), basado en características florales, sigue las divisiones propuestas por Tulasne (1849), y coloca a *Marathrum* en la tribu Mourereae. Para Engler (1930) *Marathrum* junto con el género *Rhyncholacis* componen la subtribu *Marathrinae* (tribu *Lacidae*) colocada dentro de la subfamilia Podostemoideae, en la cual la diferencia entre las subtribus *Marathrinae* y *Apinagiinae* es el largo de los entrenudos. Royen (1951) propone colocar al género *Marathrum*, en la subfamilia Podostemoideae; en la tribu *Eupodostemeae*, la cual presenta las siguientes

características: flores solitarias, fasciculadas o en inflorescencias extraxilares, pero nunca en monocasio espiciforme.

El género *Marathrum* es extremadamente difícil de separar de *Apinagia*, y las siguientes especies podrían ser referidas tanto a *Apinagia* como a *Marathrum*: *M. pauciflorum*, *M. striatifolium*, *M. aerginosum* y *Apinagia batriachifolia* (Royen, 1951). Sin embargo, este autor menciona que usando una combinación de caracteres es posible separar *Marathrum* de *Apinagia*.

En este trabajo se siguió la clasificación taxonómica propuesta por Royen (1951) para el género *Marathrum*:

Orden	Podostemales
Familia	Podostemaceae
Subfamilia II	Podostemidae
Tribu 2	Eupodostemae
Género	<i>Marathrum</i>

Descripción del género *Marathrum* Humb. & Bonp.

Hierbas acuáticas usualmente con una raíz larga y postrada, de más de 0.5 cm de diámetro, fuertemente adherida a las rocas. Hojas alternas de 3 a 50 cm de longitud, pecíolo ligeramente aplanado o cilíndrico, ensanchado en la base; hojas repetidamente pinnadas, divididas o enteras; en las pinnadas las últimas divisiones son filiformes o capiláceas con el ápice agudo u obtuso. Flores hermafroditas, actinomorfas o zigomorfas, pediceladas, axilares, protegidas por una espátula delgada de forma clavada o infundibuliforme. Pedicelos elongándose durante la antesis, con el ápice crateriforme (expandido) o sin expandirse; el ápice expandido usualmente con bordes serrulados o irregulares. Tépalos de 3-9, triangulares, alternando con los estambres. Estambres 2-9, libres, ubicados en un lado del pistilo o en una hilera rodeando al pistilo; filamentos aplanados, elongándose durante la antesis, deciduos; anteras sagitadas, basifijas. Ovario superior, elipsoidal, con 2 lóculos; estilos 2; óvulos numerosos, con placentación axilar. Fruto capsular con

2 valvas, subiguales, con 3-5 costillas cada una. Semillas pequeñas y numerosas, ovoides. Polen tricolpado, tectum espinoso.

Algunas de las características que permiten distinguir a *Marathrum elegans*, *M. haenkeanum*, *M. rubrum*, *M. shiedeianum* y *M. tenue*, se encuentran indicadas en el cuadro 1.

ESTUDIOS CROMOSÓMICOS DE LA FAMILIA PODOSTEMACEAE

La comprensión de la variación del número cromosómico dentro de la familia Podostemaceae, puede proporcionar una idea del proceso evolutivo y un apoyo para los estudios sistemáticos (Les y Philbrick, 1993).

Los primeros reportes sobre el número cromosómico en la familia Podostemaceae se realizaron utilizando la técnica de cortes florales con microtomo de rotación, por Magnus (1913), para las especies *Lawia zeylanica* (Gardn.) Tul. (= *Dalzellia ceylanica* (Gardn.) Wight) y *Podostemum subulatum* Gardn., cuyos números diploides reportados son $2n=20$ y $2n=40$, respectivamente. Gaiser (1930) confirmó el número haploide $n=10$ para *Lawia zeylanica* e indicó el número haploide $n=12-14$ para *Oenone imthurnii* Goebel (= *Apinagia imthurnii* (Goebel) Royen) y $n=8$ para *O. versteegiana* Went (= *Apinagia versteegiana* (Went) Royen). Chiarugi (1933) reportó el número diploide $2n=40$ para *Weddellina squamulosa* Tul., más tarde Darlington y Wylie (1955) obtuvieron el número haploide $n=20$ para esta misma especie.

Los estudios sobre el análisis cariomorfológico son aún escasos, Okada (1991) registró para las especies *Cladopus nymani* H. Möeller (Podostemoideae) el número cromosómico de $2n=30$ y para *Indotristicha malayana* Dransf. & Whitmore (= *Malaccotristicha malayana* (Dransf. & Whitmore) C. & G. Cusset) $2n=20$ (Tristichoideae); observándose para *C. nymani* un cariotipo de tipo bimodal, integrado por 8 pares de cromosomas grandes y 7 pares de cromosomas pequeños, un par de cromosomas metacéntricos presenta satélite. Uniyal y Mohan Ram (1994) analizaron el cariotipo de 3 especies de Podostemaceae, utilizando la técnica de aplastamiento (squash) en los extremos de los talos. El número cromosómico que obtuvieron para *Lawia zeylanica* Tul. fue de $2n=30$ y difirió del conteo previo realizado por Magnus (1913) de $2n=20$. Con fórmula cariotípica $6m+6sm+1st+2t$ (las letras indican la posición del centrómero como m, medio; sm, submedio; st, subterminal; t, terminal), *Polypleurum stylosum* J. B. Hall. ($2n=34$) presentó la siguiente fórmula cariotípica $6m+7sm+2st+2t$, mientras que para *Hydrobryopsis sessilis* Engl. ($2n=26$) la fórmula cariotípica es $3m+6sm+2st+2t$. Aunque estos estudios no son suficientes para dar una idea general

2 valvas, subiguales, con 3-5 costillas cada una. Semillas pequeñas y numerosas, ovoides. Polen tricolpado, tectum espinoso.

Algunas de las características que permiten distinguir a *Marathrum elegans*, *M. haenkeanum*, *M. rubrum*, *M. shiedeianum* y *M. tenue*, se encuentran indicadas en el cuadro 1.

ESTUDIOS CROMOSÓMICOS DE LA FAMILIA PODOSTEMACEAE

La comprensión de la variación del número cromosómico dentro de la familia Podostemaceae, puede proporcionar una idea del proceso evolutivo y un apoyo para los estudios sistemáticos (Les y Philbrick, 1993).

Los primeros reportes sobre el número cromosómico en la familia Podostemaceae se realizaron utilizando la técnica de cortes florales con microtomo de rotación, por Magnus (1913), para las especies *Lawia zeylanica* (Gardn.) Tul. (= *Dalzellia ceylanica* (Gardn.) Wight) y *Podostemum subulatus* Gardn., cuyos números diploides reportados son $2n=20$ y $2n=40$, respectivamente. Gaiser (1930) confirmó el número haploide $n=10$ para *Lawia zeylanica* e indicó el número haploide $n=12-14$ para *Oenone imthurii* Goebel (= *Apinagia imthurii* (Goebel) Royen) y $n=8$ para *O. versteegiana* Went (= *Apinagia versteegiana* (Went) Royen). Chiarugi (1933) reportó el número diploide $2n=40$ para *Weddellina squamulosa* Tul., más tarde Darlington y Wylie (1955) obtuvieron el número haploide $n=20$ para esta misma especie.

Los estudios sobre el análisis cariomorfológico son aún escasos, Okada (1991) registró para las especies *Cladopus nymani* H. Möeller (Podostemoideae) el número cromosómico de $2n=30$ y para *Indotristicha malayana* Dransf. & Whitmore (= *Malaccotristicha malayana* (Dransf. & Whitmore) C. & G. Cusset) $2n=20$ (Tristichoideae); observándose para *C. nymani* un cariotipo de tipo bimodal, integrado por 8 pares de cromosomas grandes y 7 pares de cromosomas pequeños, un par de cromosomas metacéntricos presenta satélite. Uniyal y Mohan Ram (1994) analizaron el cariotipo de 3 especies de Podostemaceae, utilizando la técnica de aplastamiento (squash) en los extremos de los talos. El número cromosómico que obtuvieron para *Lawia zeylanica* Tul. fue de $2n=30$ y difirió del conteo previo realizado por Magnus (1913) de $2n=20$. Con fórmula cariotípica $6m+6sm+1st+2t$ (las letras indican la posición del centrómero como m, medio; sm, submedio; st, subterminal; t, terminal), *Polypleurum stylosum* J. B. Hall. ($2n=34$) presentó la siguiente fórmula cariotípica $6m+7sm+2st+2t$, mientras que para *Hydrobryopsis sessilis* Engl. ($2n=26$) la fórmula cariotípica es $3m+6sm+2st+2t$. Aunque estos estudios no son suficientes para dar una idea general

sobre la morfología de los cromosomas en las Podostemaceae, si son importantes ya que la fórmula cariotípica y la longitud total de la cromatina, pueden indicar el papel que han jugado las alteraciones estructurales en su evolución.

Los pocos conteos cromosómicos de las Podostemaceae hasta el momento (cuadro 2), representan sólo un 16% de los géneros y un 3% de las especies, de los cuales *Weddelina squamulosa* Tul. , *Oenone imthurni* Goebel (= *Apinagia imthurnii* (Goebel) Royen) y *O. versteegiana* Went (= *Apinagia versteegiana* (Went) Royen) son especies americanas (un 1% de las especies totales). Esta información por lo tanto no permite hacer consideraciones generales en cuanto al número cromosómico básico para la familia (Les y Philbrick, 1993). La falta de estudios cariológicos en la familia provocó el interés para iniciar los estudios de este tipo en el género *Maralthrum*, el más diverso de México y, por lo tanto, contribuir al conocimiento taxonómico de esta importante familia de plantas acuáticas.

Cuadro 1. Características distintivas de las especies del género *Marathrum* presentes en México. Modificado de Royen (1951) y Novelo y Philbrick (1993).

Carácter	<i>M. elegans</i>	<i>M. haenkeanum</i>	<i>M. rubrum</i>	<i>M. tenue</i>	<i>M. schiedianum</i>
Distribución	Pacífico Mexicano	Pacífico Mexicano	Pacífico Mexicano	Golfo de México	Golfo de México
Ancho de las últimas divisiones de las hojas	0.3-1.3 mm	0.075-0.125 mm	0.02-0.06 mm	0.05-0.10	0.1-0.4 mm
Largo de la espata	15-20 mm	20-30 mm	7-20 mm	3-10 mm	10-10.5 mm
No. de tépalos	7-9	5-8	7-9	3(-5)	5-8
Ubicación los estambres	Alrededor del gineceo	Alrededor del gineceo	Alrededor del gineceo	En un lado del gineceo	Alrededor del gineceo
No. de estambres	7-9	5-8	7-9	2(-4)	5-8

Cuadro 2. Números cromosómicos conocidos hasta la fecha para la familia Podostemaceae.

Especie	n	2n	Referencia
<i>Cladopus nymanii</i> H. Möeller	-	30	Okada (1991)
<i>Hydrobryopsis sessilis</i> Engl.	-	26	Uniyal y Moham Ram (1994)
<i>Indostriticha malayana</i> Dransf. & Whitmore	-	20	Okada (1991)
	-	20	Magnus (1913)
<i>Lawia zeylanica</i> Tul.	10	-	Gaiser (1930)
	-	30	Uniyal y Moham Ram (1994)
<i>Oenone imthurni</i> Goebel	ca. 12-14	-	Gaiser (1930)
<i>Oenone versteegiana</i> Went	ca. 8	-	Gaiser (1930)
<i>Podostemum subulatus</i> Gardn.	-	40?	Magnus (1913)
	-	ca.40	Gaiser (1930)
<i>Polypleurum stylosum</i> J.B. Hall.	-	34	Uniyal y Moham Ram (1994)
<i>Weddelina squamulosa</i> Tul.	-	40	Chiarugi (1933)
	20	-	Darlington y Wylie (1955)

OBJETIVO GENERAL

Realizar estudios cromosómicos en 5 especies del género *Marathrum* que contribuyan a la sistemática de la familia Podostemaceae.

OBJETIVOS PARTICULARES

- a) Establecer la metodología para la germinación de semillas y la obtención de plántulas del género *Marathrum*, que permitan observar cromosomas somáticos ($2n$).
- b) Obtener el número cromosómico diploide ($2n$) y haploide (n), así como la elaboración del cariotipo de las siguientes especies: *Marathrum elegans*, *M. haenkeanum*, *M. rubrum*, *M. schiedeianum* y *M. tenue*.
- c) Análisis de los resultados para tratar de establecer similitudes intraespecíficas e interespecíficas.

MATERIALES Y METODOS

Colecta y separación del material

Del total del material colectado en el campo, se seleccionaron los frutos y los botones florales para el estudio de mitosis y meiosis, respectivamente.

Para la técnica de mitosis, se utilizaron semillas de cinco especies del género *Marathrum*, las cuales fueron colectadas en el campo, se colocaron en sobres o bolsas de papel y se dejaron secar a temperatura ambiente al menos por un mes. Con la finalidad de asegurar la maduración de las semillas, en algunos casos se pusieron en bolsas de papel en un horno a 30°C por 1-2 meses. Los ejemplares de referencia (cuadro 3) se encuentran depositados en el Herbario Nacional del Instituto de Biología de la UNAM (MEXU), las localidades analizadas están marcadas en el mapa de la figura 1.

Para la técnica de meiosis se utilizó material fijado en Farmer en el momento de la colecta. Del material disponible se seleccionaron botones florales de *Marathrum elegans*, *M. haenkeanum* y *M. rubrum*. Los ejemplares de referencia (cuadro 4) se encuentran depositados en el herbario MEXU, las localidades analizadas están marcadas en el mapa de la figura 2.

MITOSIS

Germinación de semillas

Las semillas de los frutos maduros fueron colocadas en un portaobjetos con una gota de agua. Al hidratarse, se adhirieron al vidrio por medio del mucilago que secretan las células de la testa al contacto con el agua y se dejaron secar por una hora. Para ajustar la técnica adecuada para la germinación de las semillas se utilizaron 2 variantes: 1) cajas de petri y 2) acuario.

1) En cajas de petri

Se realizaron pruebas de geminación con lotes muy pequeños de semillas (10-20 semillas cada uno), las cuales se colocaron en cajas de petri con algodón, papel filtro, agua destilada y se introdujeron a un horno a 30°C (oscuridad). Durante los cuatro primeros días se realizaron revisiones una vez al día, utilizando un microscopio de disección y posteriormente se anotó el porcentaje de germinación; se mantuvo a las semillas fuera del horno por un tiempo de 2-3 minutos.

Posteriormente se empleo está misma técnica, pero a un fotoperíodo de 12h y 24h a temperatura de $25 \pm 2^\circ\text{C}$.

Aunque las pruebas de germinación (con fotoperíodo de 12h y de 24h) permitieron comprobar que había un alto porcentaje de germinación, las condiciones anteriores no eran las adecuadas para que las plántulas crecieran lo suficiente para estudios citogenéticos.

2) En acuario

Se siguió la metodología propuesta por Philbrick y Novelo (comunicación personal), con algunas modificaciones:

a) Se uso un acuario de 50x30x25 cm, se llenó con agua destilada (pH=4-6); se colocó un poste en cada esquina para sostener una placa de vidrio, en la que se colocaron los portaobjetos con las semillas a germinar a una profundidad de 3 cm. Para mantener constante la temperatura del agua, se utilizó un

calentador de 50 watts (Radiant) y se reguló a 25°C, se conectó una bomba de acuario de dos salidas (2500cc/minx2, Elite802) para airear el agua. El acuario se colocó en un invernadero con luz natural directa.

Se revisaron los portaobjetos una vez al día utilizando un microscopio de disección, durante el período de germinación y crecimiento de las plántulas (4-10 días).

b) Posteriormente se utilizó agua de la llave esterilizada (pH=7), sistema de filtrado continuo con filtros de carbón activado y arena fina en el fondo del acuario, luz blanca (50 watts) con un fotoperíodo de 12 horas.

c) En un tercer ensayo; se colocaron los portaobjetos con las semillas fijadas a ellos dentro de un acuario de 30x16x18 cm, a una profundidad de 3 cm, el cual se acondicionó previamente utilizando agua de la llave esterilizada (Philbrick y Novelo, 1994), aereación constante empleando una bomba de dos salidas (2500cc/minx2), sistema de filtrado continuo con filtros de carbón activado y arena fina en el fondo, un calentador de acuario para mantener una temperatura de $25\pm 2^{\circ}\text{C}$ y un fotoperíodo de 12h proporcionado por una lámpara (luz blanca de 50watts). Para eliminar el cloro que contiene el agua de la llave se le adicionó un anticloro (acuabel) y como alimento se utilizó un fertilizante para plantas acuáticas (sera-florena) con oligoelementos, minerales y hierro (5 ml de abono para 20 litros de agua). Figura 3 .

Con la finalidad de encontrar el tamaño adecuado de las plántulas con tejido meristemático activo y por lo tanto el horario de división celular, se llevaron a cabo pruebas con diferentes horarios de pretratamiento; 6:30, 7:00, 7:15; 7:30, 8:00, 10:00, 12:00, 13:00 y 14:00 horas. Para cada una de las especies tratadas; en cada uno de los ensayos mencionados anteriormente para la germinación de plántulas.

Técnica para mitosis

Una vez que germinaron las semillas y alcanzaron la etapa de plántulas, se pretrataron introduciendo el portaobjetos con todas las plántulas en una solución de 8-hidroxiquinoleína (0.002 M) durante cinco horas, se colocaron en la oscuridad y a una temperatura ambiente de $\pm 18^{\circ}\text{C}$. Posteriormente, las plántulas se lavaron eliminando el mitostático y se procedió a fijarlas en solución Farmer (alcohol etílico absoluto-ácido acético glacial 3:1) en donde permanecieron por lo menos una hora, para continuar con la técnica de tinción de los cromosomas.

Las plántulas fijadas fueron lavadas con agua destilada para su posterior tinción, se hidrolizaron con HCl 1N a 60°C por 10-15 minutos y después fueron colocadas en solución Feulgen preparada de acuerdo

a García (1988) durante dos horas. Con ayuda del microscopio de disección se separó la zona del meristemo apical de los colledones y se colocaron las partes meristemáticas en un portaobjetos limpio, al cual se le agregó una gota de aceto-orceína al 1%; se le colocó el cubreobjetos y se procedió a realizar un aplastamiento suave con el fin de separar las células y revisarlas al microscopio.

Cuando se observaron buenos campos, es decir, células completas con cromosomas bien separados y en donde su forma fuera nítida., las preparaciones se hicieron permanentes; utilizando el método del hielo seco (Conger y Fairchild, 1953), se montaron en bálsamo de Canadá y se dejaron secar en un horno a 30°C durante 2 semanas.

Las preparaciones secas fueron revisadas y los mejores campos se fotografiaron con un microscopio Axioscop Carl-Zeiss, implementado con una cámara fotográfica Contax. De cada especie se realizaron los conteos cromosómicos de 5 a 10 células y de las mismas se realizaron las mediciones para la elaboración de los cariotipos.

MEIOSIS

Técnica para meiosis

Como se mencionó anteriormente para el análisis cromosómico en etapa de miosis, se utilizó material fijado en el campo. Con ayuda del microscopio de disección, fueron seleccionados y separados los botones florales de diferentes tamaños y se colocaron en una caja de Petri; los botones se agruparon por tamaño.

De los botones más pequeños; las anteras fueron separadas y colocadas en un portaobjetos, se fragmentó el tejido para permitir la ruptura de los sacos polínicos y la salida de las células, se agregó una gota de aceto-carmin 1%, se maceró el tejido para separar las células, se calentó ligeramente el portaobjetos, para lograr una mejor tinción de la cromatina. Enseguida se colocó una gota de solución de Hoyer, se mezcló y calentó nuevamente, se colocó el cubreobjetos y se observó al microscopio de luz.

Las preparaciones en las que se encontraron células madres del polen (CMP) con cromosomas bien separados en profase I y metafase I, en un solo plano, se dejaron secar una a 2 semanas; en caso de ser necesario se aplicó ligera presión para separar más los cromosomas, de los mejores campos se tomaron fotografías.

Elaboración de los cariotipos

Se seleccionaron de 3 a 5 células de cada especie, las cuales se fotografiaron y amplificaron. De los cromosomas de estas fotografías se tomaron las siguientes medidas; longitud total, longitud del brazo largo, longitud del brazo corto.

Los cromosomas se clasificaron de acuerdo al criterio de Levan et al. (1964). Se calculó la media y la desviación estándar de la longitud total y de los brazos de cada par de cromosomas homólogos.

La cantidad total de cromatina se consideró con base en la longitud total de los cromosomas (la suma de la longitud total entre el número de células estudiadas). Se determinó el índice centromérico (ic) para clasificar los cromosomas, usando la fórmula;

$$ic = \frac{p}{p+q} (100)$$

p= longitud del brazo corto

q=longitud del brazo largo

Se determinó los índices de asimetría de los cariotipos; F(%), TF(%) de acuerdo a Shina y Roy (1979), utilizando las siguientes fórmulas:

$$F\% = \frac{\text{longitud del brazo corto}}{\text{longitud total del cromosoma}} (100)$$

$$TF\% = \frac{\text{longitud total de los brazos cortos}}{\text{longitud total de los cromosomas}} (100)$$

Cuadro 3. Datos de colecta de las especies del género *Marathrum* utilizados para los estudios mitóticos. Los ejemplares de referencia son colectas realizadas por A. Novelo.

Especie	Colector	No. Colecta	Localidad
<i>M. elegans</i>	Novelo & Philbrick	1238	GUERRERO: Mpio. Coahuayutla. Río San Antonio, a 5 km al sur del poblado San Antonio. Alt. 210 msnm (localidad tipo).
<i>M. haenkeanum</i>	Novelo & Philbrick	s/n	*Ejemplares de referencia: 679, 1174. JALISCO: Mpio. Puerto Vallarta. Río localizado a 33.5 km al N de El Tuito y aprox. a 10 km al SO de Puerto Vallarta. Alt. 5 msnm.
<i>M. haenkeanum</i>	Novelo & Philbrick	1267	GUERRERO: Mpio. Coyuca de Benitez. Río Coyuca, a 45 km al norte del poblado Coyuca de Benitez. Alt. 100 msnm.
<i>M. haenkeanum</i>	Novelo & Philbrick	1356	GUERRERO: Mpio. Ayutla de los Libres. Río en este poblado, aprox. 94 km al este de Tierra Colorada. Alt. 330 msnm.
<i>M. haenkeanum</i>	Novelo & Philbrick	1368	GUERRERO: Mpio. Xochistlahuaca. Río que atraviesa la brecha, cerca del poblado de Zocoapan, aprox. a 26 km al noreste de Ometepec. Alt. 250 msnm.
<i>M. rubrum</i>	Novelo & Philbrick	s/n	*Ejemplares de referencia; 979, 982, 1003, 1035, 1117, 1182, 1183, 1184. JALISCO: Mpio. Cabo Corrientes. Río Horcones a 17 km al S de Puerto Vallarta rumbo a Chamela. Alt. 300 msnm.
<i>M. rubrum</i>	Novelo & Philbrick	1361	GUERRERO: Mpio. Cuauhtepec. Río el Velero, a 13 km al norte del poblado Cuauhtepec, cerca de Cruz Grande. Alt. 370 msnm.
<i>M. shiedianum</i>	Novelo & Calzada	1414	VERACRUZ: Mpio. Actopan. Río Actopan en el poblado de la Esperanza. Aprox. 40 km al sureste de Jalapa. 160 msnm.
<i>M. tenue</i>	Novelo & Calzada	1431	OAXACA: Mpio. San Felipe Usila. Río Usila, 200 m arriba de la unión con el río Santiago, aprox. a 45 km al sur de Jalapa de Díaz. Alt. 180 msnm.

* Colectas realizadas exclusivamente para los estudios cariológicos.

Cuadro 4. Datos de colecta de las especies del género *Marathrum* utilizadas para los estudios meióticos.

Especie	Colector	No. col.	Localidad
<i>M. elegans</i>	Novelo & Philbrick	996	NAYARIT: Mpio. San Blas. Río Miramar, afueras de poblado Miramar, a 52 km al oeste de Tepic. Alt. 10 msnm.
	Novelo & Philbrick	1004	NAYARIT: Mpio. Santiago Ixcuintla. Río El Palillo, 3 km oeste de Navarrete, 20 km NE de San Blas. Alt 100 msnm.
<i>M. haenkeanum</i>	Novelo R., A.	1009	GUERRERO: Río en el poblado Santa Rosa, 74 km SE de Zihuatanejo rumbo a Acapulco. Alt. 10 msnm.
	Novelo & Philbrick	1356	GUERRERO: Mpio. Ayutla de los Libres. Río localizado aprox. 94 km al este de Tierra Colorada. Alt. 330 msnm.
	Novelo R., A.	1409	JALISCO: Río las Juntas, aprox. 52 km al sur de Puerto Valiarta. Alt. 300 msnm.
<i>M. rubrum</i>	Novelo & Philbrick	1361	GUERRERO: Mpio. Cuauhtepic. Río El Velero, en el poblado de Coacoyulichan, al norte de Cuauhtepic cerca de Cruz Grande. Alt. 370 msnm.

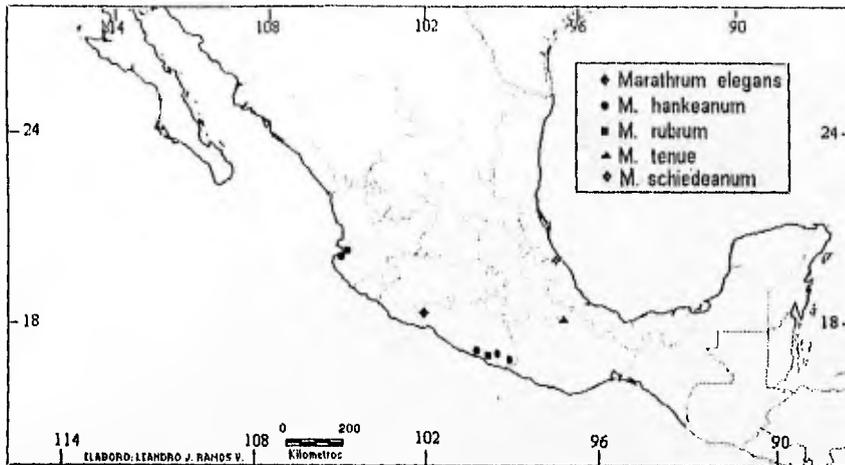


Figura 1. Mapa de localización de las colectas utilizadas para la técnica de mitosis del género *Marathrum* en México.

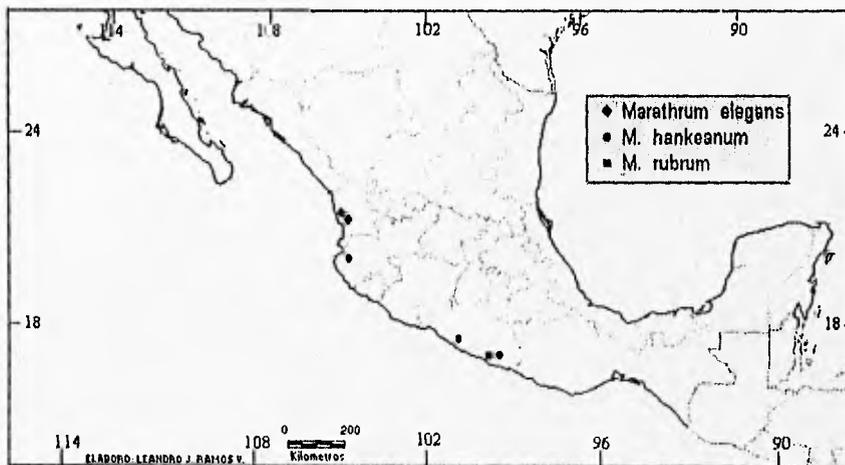


Figura 2. Mapa de localización de las colectas utilizadas para la técnica de meiosis del género *Marathrum* en México.

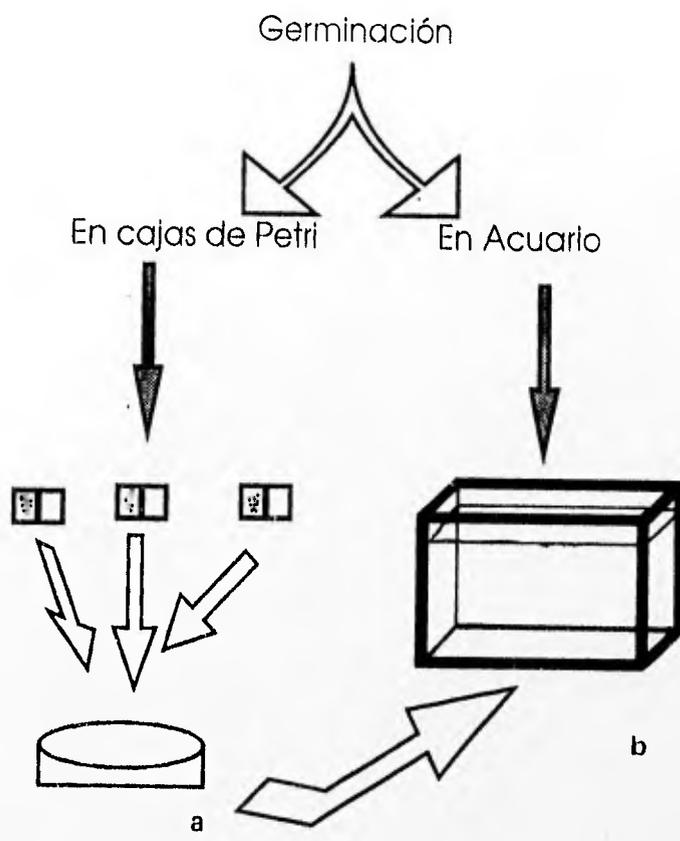


Figura 3. Esquema que ilustra el método de germinación en cajas de petri. a. en acuario. b.

RESULTADOS

De cada uno de los ensayos realizados, para encontrar la técnica adecuada en la germinación de semillas, se obtuvieron los siguientes resultados.

1) En cajas de petri

Cuando se utilizó como método de germinación de semillas para las especies de *Marathrum*: cajas de petri introducidas en un horno, los resultados fueron negativos para todas las especies debido a que estas semillas no germinan en la obscuridad, excepto para algunas semillas de *M. haenkeanum*.

El porcentaje de germinación de semillas en cajas de petri a un fotoperíodo de 12h y 24h luz a temperatura de $25\pm 2^{\circ}\text{C}$ fue mayor de 50%, los resultados fueron negativos debido a que las condiciones no eran suficientes para obtener cierta frecuencia de división celular y al aplicar la técnica de mitosis tampoco fue posible establecer el horario de división celular en estas plantas.

Para todas las colectas (nueve) de cinco especies del género *Marathrum* la germinación inicio al 4° día de ser colocadas en las cajas de petri, el porcentaje máximo de germinación ($\geq 80\%$) y crecimiento se observó entre el 9° y 11° día, después de este tiempo las plántulas empezaban a presentar clorosis y a los 12-14 días morían.

2) En acuario

a) El acuario colocado inicialmente en un invernadero con luz natural directa, presentó las condiciones óptimas de germinación sólo para semillas de *Marathrum haenkeanum*, el porcentaje fue mayor de 70% y las plántulas crecieron lo suficiente para aplicar la técnica de mitosis. Posteriormente fue difícil mantenerlas ya que surgieron problemas de contaminación por algas y fluctuaciones de temperatura, que impidieron que las semillas germinaran adecuadamente. Se observó que las plántulas del género *Marathrum* son sensibles a pH de tipo ácido (pH=4-6), cantidad de cloro, temperatura, fotoperíodo, aireación, etc. Cuando las condiciones para estas plantas acuáticas no son las adecuadas se ve afectado su crecimiento, presentan clorosis y mueren.

b) En el método empleado para germinación de semillas, utilizando agua de la llave esteriliza con un pH=7, el porcentaje de germinación fue mayor de 70%. Los resultados fueron negativos al aplicar la técnica de mitosis, debido a que en ninguna de las colectas fue posible encontrar divisiones celulares.

c) Este fue el método que dio mejores resultados, tanto para obtener un alto porcentaje de germinación ($\geq 90\%$), como para la obtención de plántulas con meristemas apicales activos; ya que en estos se pudo encontrar divisiones celulares somáticas en diferentes etapas de mitosis.

Se obtuvieron plántulas de las siguientes especies; *Marathrum elegans*, *M. haenkeanum*, *M. rubrum* y *M. tenue*. Las semillas de *M. schiedeianum* no germinaron en estas condiciones.

Al romper la testa (4º día), el hipocótilo es de color verde y posiblemente es fotosintético, de acuerdo con Philbrick (1984), surge en el mismo plano del eje longitudinal de la semilla y posteriormente dobla hacia abajo (figura 2a). El ápice de la radícula queda cercano al sustrato, de ella se originan las raicillas de la plántula por elongaciones de la pared celular de células epidérmicas, éstas van a servir de mecanismo de unión al sustrato, adhiriéndose a él por secreción de una sustancia adhesiva. De la base del hipocótilo, entre los cotiledones surge el meristemo apical del eje primario (epicótilo).

El tamaño adecuado para el pretratamiento de las plántulas es entre 0.57 mm a 1.18 mm de longitud que corresponde a un período de germinación y crecimiento de 7-10 días; en esta etapa se encontraron células meristemáticas en división (Figura 2b), lo que permitió el estudio de los cromosomas metafásicos. Aunque de igual forma es importante el horario de pretratamiento para encontrar divisiones celulares, en este trabajo se observó que el horario de división celular óptimo es de las 6:45 a 7:10 am para 3 especies del género *Marathrum* y sólo para *M. haenkeanum* este rango es un poco más amplio (6:30-7:15 am y a las 12:00 horas).

El método de germinación utilizando un acuario en condiciones controladas, permitió que el meristemo apical de las plántulas creciera hasta alcanzar un tamaño adecuado, el cual presentó división celular. Este fue del 1.34% para *Marathrum elegans*; de 3.04% para *M. haenkeanum*; 0.52% para *M. rubrum* y de 0.53% para *M. tenue*.

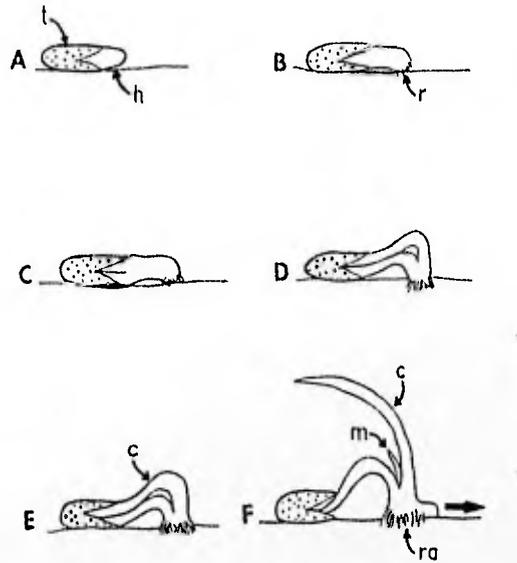


Figura 4. Secuencia de la germinación y desarrollo de una plántula del género *Marathrum*. A. Radícula e hipocótilo emergiendo de la testa (día 4). B-C. Unión del hipocótilo al sustrato por medio de raicillas (día 5-6). D-E. Cotiledones emergiendo (día 8). F. Plántula madura con dos cotiledones, creciendo entre estos, el meristemo apical y las raicillas en la base del hipocótilo que se forman por elongaciones celulares (día 9). (c=cotiledón; h=hipocótilo; m=meristemo apical; r=radícula; ra=raicillas; t=testa). Diagrama tomado de Philbrick, 1984. Escala 1 mm.



Figura 5. Fotografía de una plántula de *Marathrum haenkeanum*. Con dos cotiledones, creciendo entre estos el meristemo apical y las raicillas en la base del hipocótilo por elongaciones celulares (día 9). Escala 0.1 mm.

El número diploide determinado para cuatro especies de *Marathrum* es de $2n=28$ (figuras 6-8), sólo se determinó el número haploide $n=14$ para *M. haenkeanum* (figura 7, cuadro 5). Estos números son reportados por primera vez para el género *Marathrum*.

Del análisis de los resultados obtenidos, se indican las siguientes características cromosómicas (cuadro 8): el número cromosómico diploide ($2n$), intervalo de longitud de los cromosomas, promedio de la longitud de los cromosomas, fórmula cariotípica, número fundamental, longitud total de la cromatina e índices de asimetría $F(\%)$, $TF(\%)$.

En la figura 11, se compara la cantidad de cromatina (longitud en μm) entre las especies tratadas en donde *M. tenue* fue la especie que presentó una longitud mayor con $40.61 \mu\text{m}$.

Marathrum elegans. $2n=28$. (figura 6a-b). En el cuadro 8 se observa para esta especie un intervalo de longitud de cromosomas de 0.55 a $1.74 \mu\text{m}$ con un promedio de longitud de $1.16 \mu\text{m}$, mientras que la longitud de la cromatina es de $32.51 \mu\text{m}$, la cual representó el valor más bajo de las cuatro especies analizadas. El número de células con buena contracción de sus cromosomas no fue suficiente para la elaboración del cariotipo, sin embargo, permitió la determinación de los parámetros ya mencionados.

Marathrum haenkeanum. $2n=28$. (figuras 6c-d, 7a-b y 9; cuadros 6 y 8). En la fórmula cariotípica se observan 11 pares de cromosomas metacéntricos y 3 submetacéntricos. En la figura 6d se muestra un par de cromosomas con una constricción secundaria, aunque en este trabajo sólo fue posible observar estas constricciones en un sólo campo celular. Este número se confirmó con los resultados obtenidos en meiosis con un $n=14$. El $n.f.=28$. El intervalo de longitud de los cromosomas es de 0.944 a $1.646 \mu\text{m}$, con un promedio de longitud de $1.26 \mu\text{m}$, mientras que la longitud total de la cromatina es de $35.30 \mu\text{m}$. El índice $F(\%)$, presentó un rango de 33.33 a 45.89 y un índice $TF(\%)$ de 42.31 , valor superior al registrado en *M. rubrum*.

Marathrum rubrum. $2n=28$. (figuras 8a-b y 10; cuadros 7 y 8). Presenta una fórmula cariotípica con 14 pares de cromosomas metacéntricos. Un $n.f.=28$. El intervalo de longitud de los cromosomas es de 0.87 a $1.416 \mu\text{m}$, con un promedio de longitud de $1.23 \mu\text{m}$, mientras que la longitud total de la cromatina es de $34.5 \mu\text{m}$. El índice $F(\%)$, presentó un rango de 39.98 a 47.41 y un $TF(\%)$ de 34.50 .

Marathrum tenue. $2n=28$. (figuras 8c-d). En el cuadro 7 se observa para esta especie un intervalo de longitud de cromosomas de 0.95 a 2.07 μm , con un promedio de longitud de 1.45 μm , mientras que la longitud total de la cromatina es de 40.61 μm , la más alta de todas las especies, al igual que en *M. elegans* no fue posible la elaboración del cariotipo.

MEIOSIS

En cuanto a la técnica de meiosis, los resultados fueron negativos para cinco de las seis colectas estudiadas, de un total de tres especies; *Marathrum elegans*, *M. haenkeanum* y *M. rubrum*. Sólo se observaron cromosomas meióticos en *M. haenkeanum*, la cual presentó la formación de 14 bivalentes y una segregación normal (figura 7).

Cuadro 5. Números cromosómicos en diferentes poblaciones de cuatro especies del género *Marathrum*.

Especies	Colector	No. col.	Estado	2n	n
<i>M. elegans</i>	Novelo & Philbrick	1238	Guerrero	28	*
<i>M. haenkeanum</i>	Novelo & Philbrick	s/n	Jalisco	28	*
		1267	Guerrero	28	*
		1356	Guerrero	28	*
		1368	Guerrero	28	*
<i>M. rubrum</i>	Novelo & Philbrick	1409	Jalisco	*	14
		s/n	Jalisco	28	*
<i>M. tenue</i>	Novelo & Calzada	1361	Guerrero	28	*
		1431	Oaxaca	28	*

*=números cromosómicos no determinados.

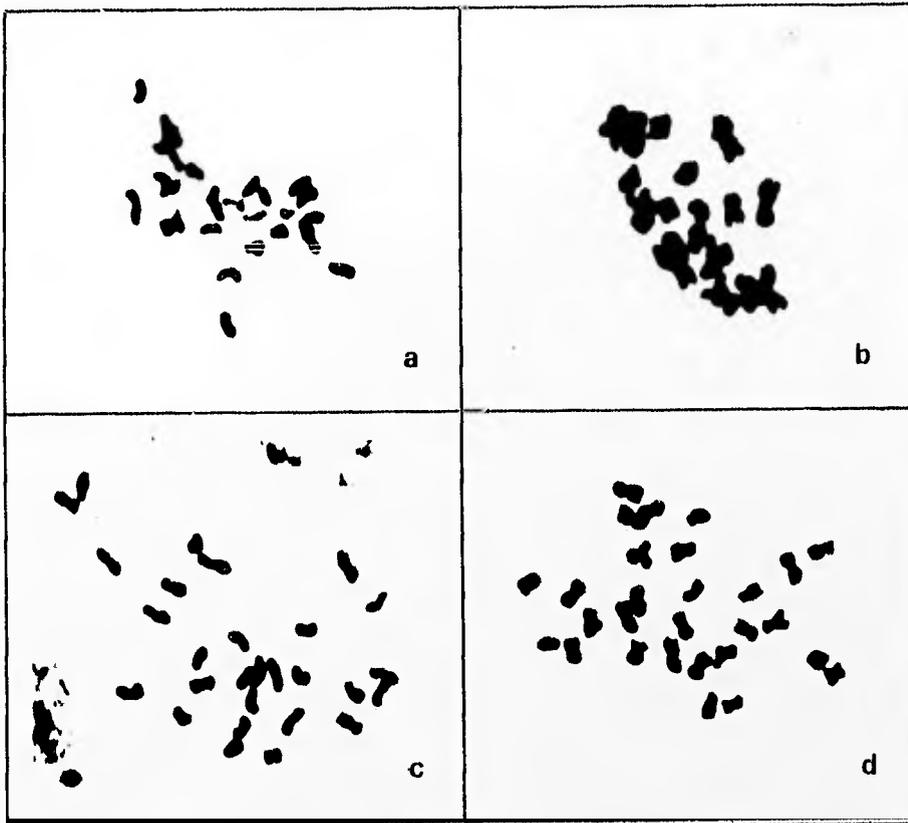


Figura 6. Cromosomas somáticos de: *Marathrum elegans*, a-b, *M. haenkeanum*, c-d; ambas especies con $2n=28$. Las flechas en d, indican cromosomas con constricción secundaria (sólo se observó en un campo celular). Escala $3\text{cm} = 10\mu\text{m}$.



Figura 7. Cromosomas meióticos de *Marathrum haenkeanum* de una población de Jalisco, con $n=14$, en metafase I. a. Cromosomas meióticos en granos de polen $n=14$, en metafase II. b. $3\text{cm} = 10\mu\text{m}$.

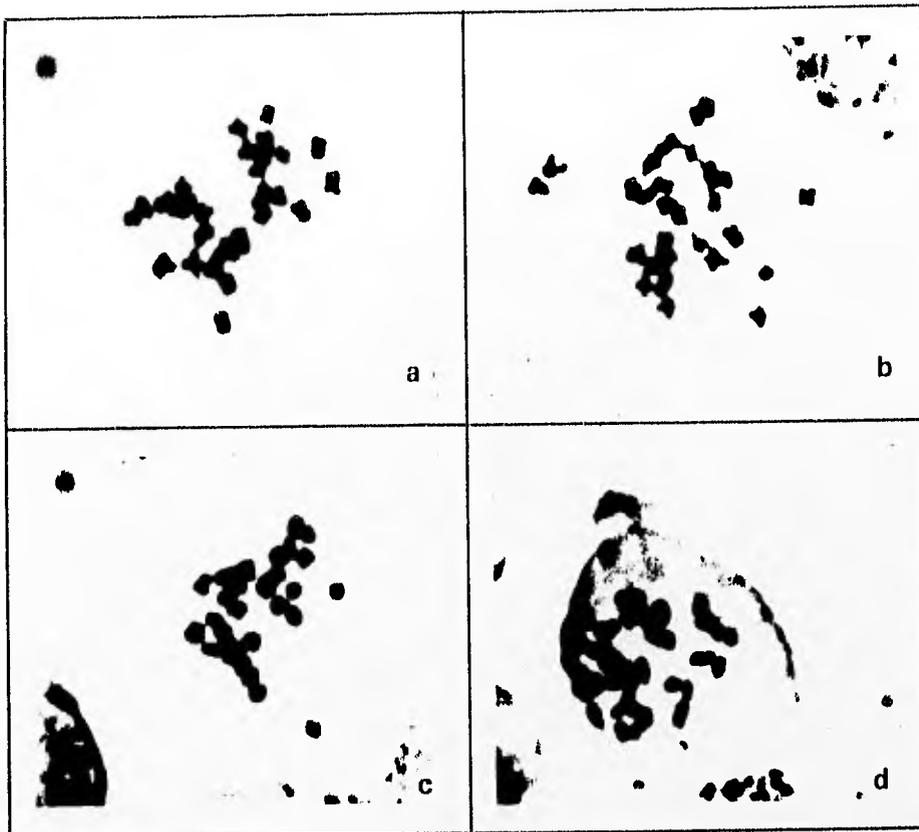


Figura 8. Cromosomas somáticos de: *Marathrum rubrum*, a-b. *M. tenue*, c-d; ambas especies con $2n=28$.

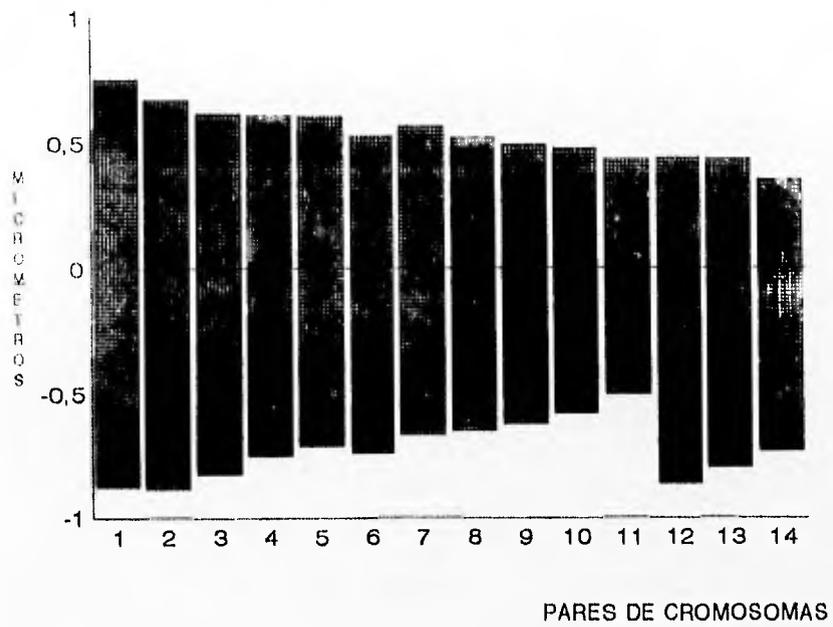


Figura 9. Idiograma de los cromosomas de *Maraltrum haenkeanum*, mostrando 1-11 metacéntricos, 12-14 submetacéntricos. La línea media indica la posición del centrómero en cada uno de los cromosomas.

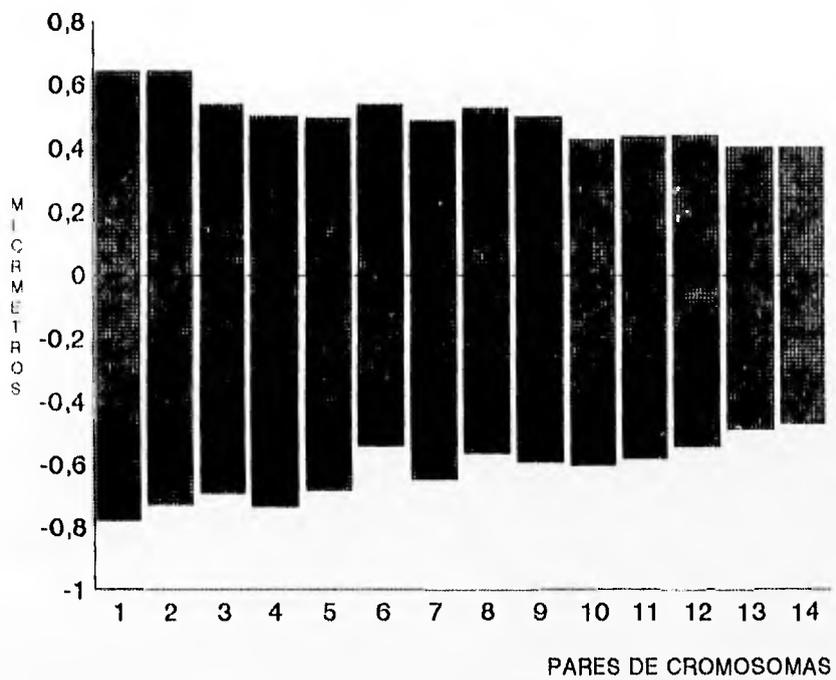


Figura 10. Idiograma de los cromosomas de *Marathrum rubrum*, mostrando 1-14 metacéntricos. La línea media indica la posición del centrómero en cada uno de los cromosomas.

Cuadro 6. Promedio de la longitud total de los cromosomas y brazos de los 14 homólogos de *Marathrum haenkeanum*. I.C. es el índice centromérico; m, metacéntrico, sm, submetacéntrico; \bar{x} , media; s, desviación estándar.

Homólogos	Longitud de los cromosomas $\bar{x} \pm s$	Longitud de los brazos largos $\bar{x} \pm s$	Longitud de los brazos cortos $\bar{x} \pm s$	I.C.	Tipo
1	1.646±0.203	0.878±0.112	0.750±0.101	45.56	m
2	1.560±0.183	0.884±0.120	0.670±0.130	42.94	m
3	1.440±0.213	0.826±0.116	0.614±0.100	42.63	m
4	1.364±0.173	0.754±0.650	0.606±0.127	44.42	m
5	1.316±0.178	0.712±0.103	0.604±0.086	45.89	m
6	1.274±0.193	0.742±0.107	0.526±0.088	41.28	m
7	1.234±0.217	0.668±0.145	0.566±0.080	45.86	m
8	1.172±0.173	0.650±0.123	0.520±0.057	44.36	m
9	1.116±0.19	0.626±0.091	0.490±0.107	43.90	m
10	1.056±0.141	0.582±0.055	0.474±0.093	44.88	m
11	0.944±0.109	0.505±0.074	0.433±0.054	45.86	m
12	1.308±0.157	0.866±0.119	0.436±0.049	33.33	sm
13	1.200±0.261	0.798±0.041	0.432±0.093	36.00	sm
14	1.046±0.250	0.732±0.075	0.352±0.088	33.65	sm

Cuadro 7. Promedio de la longitud de los cromosomas y brazos de los 14 homólogos de *Marathrum rubrum*. I.C. es el índice centromérico; m, metacéntrico; \bar{x} , media; s, desviación estándar.

Homólogo	Longitud de los cromosomas	Longitud de los brazos largos	Longitud de los brazos cortos	I.C.	Tipo
s	$\bar{x} \pm s$	$\bar{x} \pm s$	$\bar{x} \pm s$		
1	1.416±0.101	0.780±0.040	0.640±0.070	45.19	m
2	1.370±0.079	0.730±0.017	0.640±0.075	46.71	m
3	1.303±0.083	0.693±0.035	0.536±0.083	41.13	m
4	1.243±0.050	0.736±0.076	0.500±0.069	40.22	m
5	1.180±0.020	0.683±0.047	0.493±0.023	41.77	m
6	1.160±0.020	0.540±0.035	0.536±0.021	46.20	m
7	1.133±0.020	0.650±0.055	0.483±0.058	42.63	m
8	1.103±0.038	0.566±0.038	0.523±0.015	47.41	m
9	1.080±0.026	0.593±0.046	0.496±0.025	45.92	m
10	1.063±0.020	0.603±0.035	0.425±0.007	39.98	m
11	1.020±0.026	0.580±0.043	0.433±0.060	42.45	m
12	0.983±0.005	0.543±0.030	0.436±0.028	44.35	m
13	0.920±0.052	0.490±0.028	0.400±0.026	43.47	m
14	0.870±0.062	0.470±0.046	0.400±0.017	45.97	m

Cuadro 8. Características cromosómicas de cuatro especies del género *Marathrum*. Cromosomas metacéntricos, m; cromosomas submetacéntricos, sm; número fundamental, n.f.; índices de simetría, T.F.% y F%.

Especies	2n	Intervalo de la longitud de los cromosomas (µm)	Promedio de la longitud de los cromosomas (µm)	Fórmula cariotípica	n.f.	Longitud total de la cromatina (µm)	F(%)	TF(%)
<i>M. haenkeanum</i>	28	0.944 a 1.646	1.26	11m+3sm	28	35.30	33.33 a 45.89	42.31
<i>M. rubrum</i>	28	0.870 a 1.416	1.23	14m	28	34.50	39.98 a 47.41	43.28
<i>M. elegans</i>	28	0.550 a 1.740	1.16	*	*	32.51	*	*
<i>M. tenue</i>	28	0.950 a 2.070	1.45	*	*	40.61	*	*

* = no determinado.

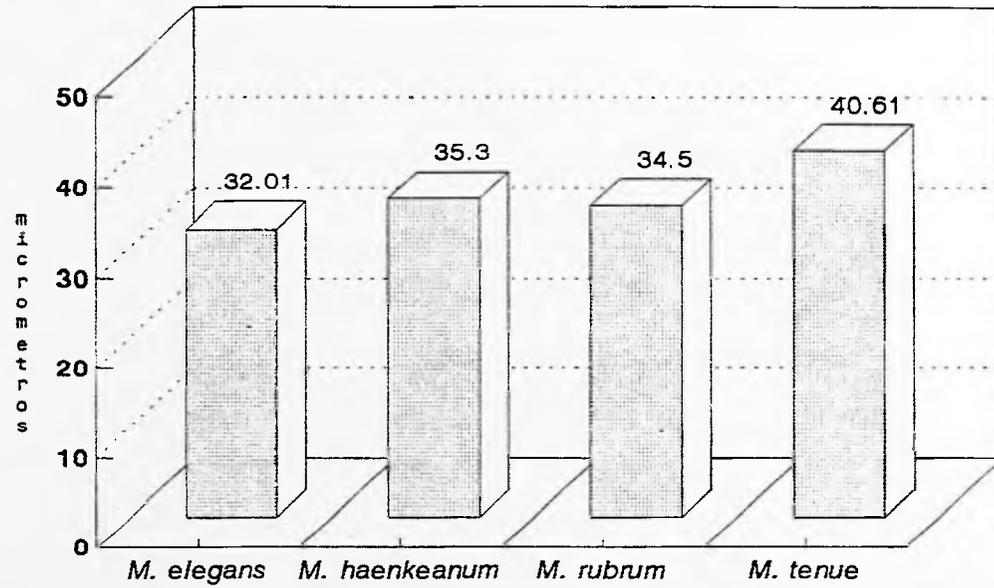


Figura 11. Cantidad total de cromatina en cuatro especies del género *Marathrum*

DISCUSIÓN

La germinación de las semillas utilizadas para este estudio inició a los cuatro días de haber sido colocadas en agua de la llave esterilizada y bajo luz artificial, observándose aproximadamente un 95% de germinación cerca de los 9 días, lo cual coincide con lo reportado por Philbrick y Novelo (1994).

1) En cajas de petri

Los resultados de germinación en cajas de petri en obscuridad con temperatura constante fueron negativos, aunque este es uno de los métodos convencionales más empleados para obtener tejido meristemático activo, en el que se puede encontrar un gran número de divisiones somáticas. En nuestro caso no funcionó ya que, las semillas de las Podostemaceae son fotoblásticas positivas, es decir, que no germinan en la oscuridad (Philbrick y Novelo, 1994).

El empleo de este método para la germinación de semillas del género *Marathrum*, con fotoperíodo de 12h luz- oscuridad y 24h de luz constante utilizando agua de la llave esterilizada, permitió el desarrollo del meristemo apical de las plántulas, pero no fue posible determinar el tiempo de ciclo celular. Por otra parte la presencia de clorosis aparentemente por falta de nutrientes es evidente a partir del octavo día, por lo tanto el meristemo apical se deterioró antes de poder utilizarlo para los estudios citológicos.

2) En acuario

Debido a que este trabajo fue de tipo exploratorio, es importante resaltar los métodos para llevar a cabo la germinación de semillas en algunas especies requirieron hacer algunas modificaciones con objeto de lograr resultados óptimos.

En la etapa de germinación de semillas en acuario, influyen múltiples factores en la obtención de células en división, como son: el pH y la luz, la concentración de nutrientes, la temperatura, etc. Por ejemplo un pH menor a 7 impide que las semillas germinen adecuadamente. En nuestro caso la exposición del acuario a luz natural directa (invernadero), no permitió un control, lo que posiblemente redujo la cantidad de células en división.

Otro factor importante que modifica la frecuencia de división es el ritmo circadiano (ritmo circadiano=la capacidad de fijar y repetir funciones a intervalos de aproximadamente 24 horas) de estas

plantas. Se sabe que el ritmo circadiano baja en la noche, y los procesos cíclicos de los organismos como la división celular se incrementan durante el día.

El bajo porcentaje de división celular para las plántulas de *Marathrum* (un rango de 0.52 a 3.04%), podría deberse a que el crecimiento es por elongación de los cotiledones y el hipocótilo, más que por división celular y este crecimiento se lleva a cabo en al menos los 10 primeros días de haber sido colocados en condiciones adecuadas (Sehgal et al, 1993). Por otro lado, este bajo porcentaje también puede indicar una asincronía en el ciclo de la división celular de estas plantas. Serán necesarios un mayor número de estudios para saber cuales son los factores que afectan dicho porcentaje de división celular.

Schnell y Cusset (1963) estudiaron el desarrollo de las plántulas de las Podostemaceae, haciendo notar la ausencia de la raíz primaria y la aparición en el polo radical de pelos unicelulares como órganos de fijación. Philbrick (1984) y Schnell y Cusset (1963), mencionaron que el crecimiento de las raicillas de las plántulas es inicialmente por la elongación de las células epidérmicas; por lo que estas estructuras no pudieron ser utilizadas para la observación de cromosomas como comunmente se hace en otras plantas.

Sin embargo, estos pelos unicelulares (radícula) son los primeros primordios de la raíz (Philbrick, 1984). A partir del desarrollo de las raíces de las Podostemaceae, se forma un eje postrado llamado tallo y el cual se adhiere fuertemente a la roca y llega a alcanzar varios centímetros de largo (Ratishauser, 1995).

Porcentajes similares de división celular en algunas especies de Podostemaceae, han sido reportados por Uniyal y Moham Ram (1994), quienes emplearon como método de germinación un medio nutritivo de cultivo de tejidos vegetales de Murashige y Skoog (1962) con sacarosa al 2% en pequeños cubos de plástico (estireno). Utilizaron porciones apicales de talos, encontrando una frecuencia de división celular del 1% y observaron mitosis en el 2% de las preparaciones, la forma de los cromosomas que ellos obtuvieron es elongada.

El número cromosómico diploide de las especies estudiadas del género *Marathrum* de $2n=28$ es determinado por primera vez para este género y difiere de los reportados hasta al momento para otros géneros de la familia Podostemaceae, con la excepción de *Oenone imthurni* Goebel (= *Apinagia*) que ha sido de $n=12-14$. La similitud en el número cromosómico entre los géneros *Marathrum* y *Apinagia* apoya su estrecha relación; Royen (1954) ha mencionado las dificultades que existen para diferenciar al género *Marathrum* de *Apinagia* y sólo a través de la suma de caracteres se puede tomar una decisión definitiva, aunque en la práctica no es tan fácil. Al respecto Lové y Lové (1974) mencionan que diferentes números

básicos en especies relacionadas, puede significar que se trata de géneros distintos, siempre y cuando esta diferencia también se correlacione con características morfológicas o de otro tipo.

El $2n=28$ reportado por primera vez para 4 especies mexicanas de *Marathrum*, sugiere que el número básico para el género probablemente es $x=14$.

Cronquist (1981) propuso para la familia Podostemaceae un número básico de $x=10$, basado en el reporte de los números cromosómicos de *Dalzellia ceylanica* con $2n=20$, *Podostemum subulatus* y *Weddellina squamulosa* con $2n=40$. Posteriormente Okada (1991) sugirió $x=5$; basándose en un complemento cromosómico de tipo bimodal en *Cladopus nymani* con $2n=30$, formado por 8 pares de cromosomas grandes y 7 pares pequeños.

Sí el número básico para la familia es $x=5$ como ha sido sugerido por Okada (1991) ó $x=10$ propuesto por Cronquist (1981), es evidente que la poliploidía y la aneuploidía han intervenido en la obtención de $n=14$. De acuerdo con esto, los números cromosómicos $2n=20$, 30 y 40 son niveles de tetraploidía, hexaploidía y octaploidía o diploidía, triploidía y tetraploidía, respectivamente. Es evidente que la información sobre el número cromosómico de las especies que constituyen a la familia Podostemaceae es muy escasa (se cuenta sólo con 3% de conteos cromosómicos a nivel de especie) y por lo tanto no son suficientes para sugerir un número básico en la familia.

La cantidad de cromatina (longitud) para las cuatro especies fue variable, aunque para *Marathrum haenkeanum* y *M. rubrum* se observó cierta similitud en los valores, los cuales fueron 35.30 y 34.50 μm respectivamente. La cantidad de cromatina para *M. elegans* fue la menor, presentando 32.51 μm , mientras que para *M. tenue* fue la mayor, con 40.61 μm . Estudios realizados por Bennett et al. (1982), Stebbins (1971), Van't Hof y Sparrow (1963) demostraron que existe una correlación positiva entre la longitud, el volúmen total de la cromatina y el tiempo mínimo del ciclo mitótico, con el contenido de ADN. Bennett (1983) señaló que un mayor contenido de ADN determina el tamaño celular, volúmen nuclear y por lo tanto los procesos de desarrollo de una planta, presentándose un ciclo celular largo, mayor duración de la meiosis y aumento en el tamaño de algunas estructuras, pero para las especies analizadas de *Marathrum* este planteamiento no se observó, ya que *M. elegans* (con menor longitud total de cromatina) presenta una longitud de la espátula de 15-20 mm, número de tépalos de 7-9 y número de estambres de 7-9, mientras que *M. tenue* (con una mayor longitud total de la cromatina) presenta una longitud de la espátula de 3-10 mm, número de tépalos de 3(-5) y número de estambres de 2(-4). Sin embargo, es necesario realizar mediciones del perímetro nuclear y celular para ver si hay una relación entre el contenido de ADN con el volúmen celular y nuclear.

Stebbins (1971) mencionó que las especies que presentan mayor cantidad de cromatina son menos avanzadas, de acuerdo a este autor, la especialización entre las especies tiende a una reducción en la longitud total de la cromatina. Lo anterior sugiere que la especie más avanzada es *Marathrum elegans* y la menos avanzada es *M. tenue*, quedando en una posición intermedia *M. Haenkeanum* y *M. rubrum*.

Bennett (1976) analizó la relación entre el contenido de ADN y el gradiente latitudinal de especies cultivadas. Encontró que algunas especies de cereales con mayor cantidad de cromatina crecen a mayores latitudes o altitudes, como *Secale afghanicum*, *S. montanum*, y *S. vavilovii*, mientras que las especies que crecen en latitudes o altitudes menores, como *S. silvestre*, *S. africanum* y *S. dighorivum* presentan menor cantidad de ADN. De acuerdo a esto, sugiere que la variación interespecífica en la cantidad de ADN en las angiospermas tiene un significado adaptativo, aunque menciona la necesidad de más estudios que indiquen la tendencia de este carácter entre los grupos de plantas. En el presente trabajo no fue posible determinar las diferencias intraespecíficas e interespecíficas en el género *Marathrum*, debido a que los datos disponibles se solapaban y no fueron suficientes para este tipo de interpretación.

Al comparar los cariotipos de *M. haenkeanum* y *M. rubrum* se observaron diferencias en la morfología de los cromosomas: el cariotipo de *M. haenkeanum* está constituido por 11 pares de cromosomas metacéntricos y 3 pares submetacéntricos (constricción secundaria en un par de cromosomas; observado en un campo celular) mientras que *M. rubrum* presenta un cariotipo con 14 metacéntricos. Al respecto Lewistky (1931) mencionó que los cariotipos simétricos son primitivos, en comparación a los asimétricos que son derivados, como es observado en *Crepis*. Con base a lo anterior, el cariotipo de *M. haenkeanum* es derivado, mientras que el de *M. rubrum* es primitivo. La tendencia hacia la asimetría (menor número de cromosomas metacéntricos) es predominante en angiospermas (Stebbins, 1971).

El grado de asimetría mayor de *M. haenkeanum* se correlacionó mediante los valores obtenidos de los índices de asimetría, ya que presentó un TF(%) de 42.31 y el rango de F(%) de 33.33 a 42.31, mientras que *M. rubrum* presentó un TF(%) de 43.28 y un F(%) de 39.98 a 47.41. Así entonces un TF(%) alto indica un cariotipo más simétrico, un rango más amplio de F(%) indica una estructura más asimétrica del cariotipo. El incremento de la asimetría posiblemente sea el resultado de inversiones pericéntricas y translocaciones homocigóticas desiguales, sin cambio en el número fundamental, convirtiendo a los cromosomas metacéntricos en submetacéntricos.

El análisis conjunto de las características cromosómicas de 4 especies del género *Marathrum*, indica una correlación positiva entre la longitud total de la cromatina, el intervalo de longitud de los cromosomas

y el promedio de la longitud de estos, de tal manera que *M. tenue* presentó los mayores valores para estos parámetros, mientras que les siguen en orden descendente, *M. haenkeanum*, *M. rubrum* y *M. elegans*.

Es necesario la obtención del cariotipo de las especies restantes para saber si la tendencia es hacia un incremento de la longitud total de la cromatina, como débilmente es sugerido por *M. haenkeanum* y *M. rubrum*, y de ser así, se esperaría que *M. tenue* tenga un cariotipo y un TF% más asimétrico, mientras que *M. elegans* sería la especie con el cariotipo y TF% más simétrico.

MEIOSIS

Como se mencionó anteriormente sólo se encontraron cromosomas metafásicos en meiosis para una sola colecta de un total 6, para tres especies del género *Marathrum*.

El análisis de la meiosis para *Marathrum haenkeanum*, mostró un comportamiento normal en la segregación de los cromosomas, tanto en metafase I como en otras fases de la meiosis. Lo observado en esta etapa del ciclo celular descarta que en la evolución cariotípica estén involucradas las translocaciones heterocigotas, que de estarlo se deberían detectar en las figuras cromosómicas durante la meiosis.

A continuación se numeran los factores que posiblemente influyeron en la pobre obtención de los cromosomas meióticos y deberían ser tomados en cuenta para estudios posteriores: a) horario de fijación de los botones florales; b) tamaño de los botones florales para la obtención de CMP (células madres del polen); y c) respecto a la colecta en su habitat natural; profundidad (en cuanto al nivel del agua) a la que deben ser tomados los botones florales, ya que este puede ser un factor importante en la maduración de los granos de polen.

CONCLUSIONES

Del estudio cariológico del género *Marathrum* se puede concluir lo siguiente:

a) El número cromosómico diploide para las poblaciones mexicanas de 4 especies del género *Marathrum* es $2n=28$.

b) El número básico para el género *Marathrum* en México probablemente es $x=14$.

c) Con base en la cantidad de cromatina el cambio del estado primitivo al derivado, sitúa a las especies en el siguiente orden; *M. tenue*, *M. haenkeanum*, *M. rubrum* y *M. elegans*.

d) Con base en las características cariológicas, *M. rubrum* se considera cariológicamente más primitivo que *M. haenkeanum*; ya que *M. rubrum* presentó mayor número de cromosomas metacéntricos y por lo tanto un cariotipo más simétrico. El cariotipo de *M. haenkeanum* se ha modificado probablemente por inversiones pericéntricas y translocaciones homocigotas desiguales.

e) En este trabajo no fue posible establecer diferencias en la cantidad (longitud) de cromatina interespecíficas e intraespecíficas de las poblaciones estudiadas del género *Marathrum* correlacionadas con los parámetros de altitud y latitud, ya que los datos disponibles se sobrelapan y no muestran diferencias significativas, estudios más específicos podrían plantearse para un futuro.

f) De los estudios realizados en meiosis, sólo fue posible observar cromosomas en una sola colecta de *M. haenkeanum*, para la cual se obtuvo un $n=14$. Las demás colectas analizadas presentaron polen desarrollado aún en los botones más pequeños.

BIBLIOGRAFÍA

- Bentham, G. y J.D. Hooker. 1880. Podostemaceae. **En:** Genera Plantarum 3: 105-115.
- Bennett, M.D. 1976. DNA amount, latitude and crop plant distribution. *Envir. Exp. Bot.* 16: 93-108.
- Bennett, M.D. 1982. Nuclear DNA density in mitotic and meiotic metaphase chromosomes of plants and animals. *J. Cell Sci.* 63: 173-179.
- Bennett, M.D., J.S. Heslop-Harrison, J.B. Smith y J.P. Ward. 1983. DNA density in mitotic and meiotic metaphase chromosomes of plants and animals. *J. Cell. Sci.* 63:173-179.
- Bonilla-Barbosa, J.R. y R.A. Novelo. 1995. Manual de identificación de plantas acuáticas del parque nacional Lagunas de Zempoala, México. Cuadernos 26. Instituto de Biología, UNAM. 168 pp.
- Chiarugi, A. 1933. Lo sviluppo del gametifito femminile della "*Weddellina squamulosa* Tut." (Podostemaceae). *Rend. R. Accad. Naz. Lincei.* 17, ser. 6, 1 sem., fase 12:1095-1100.
- Conger, A.D. y L.M. Fairchild. 1953. A quick freeze method for making smear slides permanent. *Stain Tech.* 28: 281-283.
- Cook, C.D.K. 1990. The aquatic plant book. SPB Academic Publishing. The Hague. 228 pp.
- Cronquist, A. 1981. An integrated system of classification of flowering plants. Columbia Univ. Press. New York. 162 pp.
- Cusset, C. y G. Cusset. 1988. Etude sur les Podostemales 10. Structures florales et végétatives des Tristichaceae. *Adansonia* 2: 179-218.
- Darlington, C.D. y A.P. Wylie. 1955. Chromosome atlas of flowering plants. Allen & Unwin, London. 520 pp.
- Engler, A. 1930. Podostemonales. **En:** Die natürlichen Pflanzenfamilien. Engler et Prantl. 2, 18a: 1-68.
- Gaiser, L.O. 1930. Chromosome numbers in angiosperms II. Martinus Nijhoff, The Hague. 466 pp.
- Gardner G. 1850. Observations on the structure and affinities of the plants belonging to the natural order Podostemaceae. *Calcutta J. Nat. Hist.* 7, 26:165-189.
- Gardner, J.E., J.M. Simmons y P.D. Snustad. 1991. Principles of genetics. John Wiley & Sons, INC. New York 579 pp.
- García, V.A. 1985. Sistemas Robertsonianos: Su papel en la evolución cromosómica en plantas superiores. **En:** Memorias del seminario sobre la investigación genética básica en el conocimiento y evaluación de los recursos genéticos. Jardín Botánico, Instituto de Biología, UNAM. 119 pp.

- García, V.A. 1988. Manual de técnicas de citogenética. Colegio de Posgraduados, Chapingo, México. 196 pp.
- Humboldt, A. y A. Bonpland. 1808. *Plantae aequinoctiales* 1:39, t. 11. En: Royen P. van. 1951. The Podostemaceae of the New World I. Meded. Bot. Mus. Herb. Rijks. Univ. Utrecht. 107: 1-51.
- Hutchinson, J. 1959. Families of flowering plants, I. Dicotyledons. Clarendon Press, Oxford. 510 pp.
- Jackson, B.C. 1971. The karyotype in systematics. *Annual Rev. Ecol. Syst.* 2:327-368.
- John, B. 1976. Population cytogenetic. Arnold. The Camelot LTD Southampton. England. 76 pp.
- Jones, K. 1978. Aspects of chromosome evolution in higher plants. En: H.W. Woolhouse (Ed.). *Advances Bot. Res.* Vol. 6. Academic press Inc., London. pp. 120-194.
- Kenton, A. 1986. Importancia de los cromosomas en la especiación y evolución como base para el conocimiento y caracterización de las especies vegetales con valor potencial. En: III Seminario Maximino Martínez. La aplicación de la citogenética en el conocimiento biológico de los recursos vegetales en México. Jardín Botánico del Instituto de Biología, UNAM. México. pp. 11-36.
- Les, D. y C.T. Philbrick. 1993. Studies of hybridization and chromosome number variation in aquatic angiosperms. *Aquatic Bot.* 44: 181-228.
- Levan, A., K. Fredga y A.A. Sandberg. 1964. Nomenclature for centromeric position on chromosomes. *Hereditas* 52: 201-220.
- Lewitsky, G.A. 1931. The karyotype in systematics (on the base karyology of the subfamily Helleboreae. *Bull. Appl. Bot. Gen. Pl.-Breed.* 27(1): 220-240.
- Lindley, J. 1830. An introduction to the natural system of botany. Longman, London, 374 pp.
- Lot H.A., R.A. Novelo y P. Ramírez-García. 1993. Diversity of Mexican aquatic vascular plant flora. En: Biological diversity of Mexico; Origins and distribution. T.P. Ramammorthy, R. Bye, A.H. Lot y J. Fa (Editores). Oxford Univ. Press. New York. pp. 577-591.
- Löve, A. and D. Löve. 1974. Cytotaxonomical atlas of the Slovenian flora. Cramer, Germany, vol.1, 121 pp.
- Magnus, W. 1913. Die atypische Embryoentwicklung des Podostemaceen. *Flora* 105: 275-336.
- Mauritzon, J. 1933. Über die Syst. Stellung de Familien Hydrostachyaceae und Podostemaceae. *Botanisk Notiser.* Heft. 1-3: 172-180. En: Royen, P. 1951. The Podostemaceae of the New World I. Bot. Mus. Herb. Rijks. Univ. Utrecht. 107: 1-51.
- Mercado, P. y R. Lira. 1994. Contribución al conocimiento de los números cromosómicos de los géneros *Sechium* P. Br. y *Sicana* Naudin (Cucurbitaceae). *Acta Bot. Mex.* 27:7-13.

- Moore, D. M. 1979. Citogenética vegetal. Omega, Barcelona, España. 64 pp.
- Morán, R. 1949. Why count chromosomes?. *Desert Pl. Life*. 21: 21-27.
- Murashige, J. y F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Pl.* 15: 473-497.
- Novelo, R.A. y C.T. Philbrick. 1993. *Vanroyenella*: a new genus of Podostemaceae from Jalisco, Mexico. *Syst. Bot.* 18(1):64-67.
- Novelo, R.A. y C.T. Philbrick. 1995. A new species of *Oserya* (Podostemaceae) from Jalisco, Mexico. *Novon* 5 (1): 54-56.
- Okada, H. 1991. Karyomorphological studies of *Cladopus nymani* H. Möll. and *Indostriticha malayana* Pransl. et Whitmore (Podostemaceae sensu lato) from Malesian wet tropics. *J. Jap. Bot.* 66: 205-210.
- Palomino, G. 1986. La aplicación de la citogenética en el conocimiento biológico de los recursos genéticos. En: Memorias del III seminario Maximino Martínez: La aplicación de la citogenética en el conocimiento biológico de los recursos vegetales en México. Jardín Botánico, Instituto de Biología. UNAM. Págs. 1-10
- Palomino, H.G. 1995. Estudios citogenéticos de plantas mexicanas. *Plantas: Biotecnología, Agronomía, Nutrición*. COFAA-INP. México. 11 pp.
- Philbrick, C.T. y G.E. Crow. 1983. Distribution of *Podostemum ceratophyllum* Michx. (Podostemaceae). *Rhodora* 85(843): 325-342.
- Philbrick, C.T. 1984. Aspects of floral biology, breeding system and seed and seedling biology in *Podostemum ceratophyllum* (Podostemaceae). *Syst. Bot.* 9(2):166-174.
- Philbrick, C.T. y R.A. Novelo. 1993. River-Weeds: A fascinating family of aquatic flowering plants. *Aquaphyte* 13(1):1-7.
- Philbrick, C.T. y R.A. Novelo. 1994. Seed germination of Mexican Podostemaceae. *Aquatic Bot.* 48:145-151.
- Philbrick, C.T. y R.A. Novelo. 1995. New World Podostemaceae: Ecological and evolutionary enigmas. *Brittonia* 47 (2):210-222.
- Ratishauser, R. 1995. Developmental patterns of leaves in Podostemaceae compared with more typical flowering plants: saltational evolution and fuzzy morphology. *Can. J. Bot.* 73: 1305-1317.
- Richard, L.C. 1815. Podostemaceae (Podostemeae): En: Humboldt, Bonpland & Kunth. *Nova. Gen. et Species Plantarum* 1: 246.

- Rieger, R., A. Michelis y M.M. Green. 1982. Diccionario de genética y citogenética. Alhambra, Madrid. 530 pp.
- Robertis, E.D.P. y E.M.P. Robertis. 1990. Biología celular y molecular. Ateneo. Argentina. 530 pp.
- Romo, C.V., R. Scogin, C.T. Philbrick y R.A. Novelo. 1993. A phytochemical study of selected Podostemaceae: systematic implications. *Aliso* 13(4): 513-520.
- Royen, P. Van. 1951. The Podostemaceae of the New World I. *Meded. Bot. Mus. Herb. Rijks. Univ. Utrecht.* 107: 1-51.
- Royen, P. Van. 1954. The Podostemaceae of the New World III. *Acta Bot. Neerl.* 3:215-263.
- Rzedowski, J. 1991. El endemismo en la flora Fanerogámica Mexicana: Una apreciación analítica preliminar. *Acta Bot. Mex.* 15:47-64.
- Sáez, F.A. y H. Cardoso. 1978. Citogenética básica y biología de los cromosomas. Secretaría General de la Organización de los Estados Americanos, Washington, D.C. 124 pp.
- Schleiden, M.J. 1839. *Über Bildung des Eichens und Entstehung des Embryos bei den Phanerogamen.* Nova Acta Phys.-Med. Acad. Caes. Leop.-Carol. Nat. Cur. 11:114-117.
- Schnell, R. y C. Cusset. 1963. Remarques sur la structure des plantules des Podostémonacées. *Adansonia* 3:358-369.
- Sehgal, A., Mohan Ram, H.Y. y J.R. Bhatt. 1993. In vitro germination, morphogenesis and flowering of an aquatic angiosperm, *Polypleurum stylosum* (Podostemaceae). *Aquatic Bot.* 45(4):269-283.
- Singh, R.J. 1993. *Plant cytogenetics.* CRC, United States. 391 pp.
- Sinha, S.S.N. y H. Roy. 1979. Cytological studies in the genus *Phaseolus*. I. Mitotic analysis in fourteen species. *Cytologia* 44:191-199.
- Stace, C.A. 1980. *Plant taxonomy and biosystematics.* University Park Press, Baltimore. 279 pp.
- Stebbins, G.L. 1971. *Chromosomal evolution in higher plants.* Addison-Wesley Publishing Co., London. 216 pp.
- Swason, C.P., T. Merz y W.J. Young. 1968. *Citogenética.* UTEHA. México. 321 pp.
- Tulasne, L. 1849. *Podostemacearum.* *Ann. Sci. Nat., Bot.* 11: 87-114.
- Uniyal, P.L. y H.Y. Moham Ram. 1994. Karyomorphological studies in some members of Podostemaceae. *Aquatic Botany.* 47: 85-90.
- Van't Hof, J. y A.H. Sparrow. 1963. A relationship between DNA content nuclear volume, and minimum mitotic cycle time. *Proc. Natn. Acad. Sci. USA.* 49:897-902.

Warming, E. 1890. Podostemaceae. *En: Engler et Plantl. Nat. Pfl. 1^o Aufl. 2a.* 1-22.

White, M.J.D. 1957. Cytogenetics and systematic entomology. *Ann. Rev. Entomol.* 2: 71-90.

Willis, M.A. 1914. A new natural family of flowering plants: Tristichaceae. *J. Linn. Soc., Bot.* 43:49-54.