

215
2 ej



Universidad Nacional Autónoma de México

FACULTAD DE CIENCIAS

“ESTUDIO CITOGENETICO DE ALGUNAS ESPECIES DEL GENERO *Crotalaria* L. (FAMILIA LEGUMINOSAE)”

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
B I O L O G O
P R E S E N T A

RICARDO ANTONIO VAZQUEZ RAMIREZ

MEXICO D.F.

1990

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 está 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.

INDICE

	páginas
RESUMEN.....	1
INTRODUCCION.....	1
MATERIALES Y METODOS.....	26
RESULTADOS.....	32
DISCUSION.....	49
CONCLUSIONES.....	68
BIBLIOGRAFIA.....	70

RESUMEN

El presente estudio contribuye a la caracterización cromosómica de cuatro especies del género *Crotalaria*, siendo; *C. spectabilis* Roth., *C. longirostrata* Arn. y Hook., *C. pumila* Ort. y *C. incana* L., colectadas en Veracruz, Guerrero, el Distrito Federal, Puebla, Hidalgo, Tabasco y Chihuahua.

De cada especie se determinaron los números cromosómicos: somático ($2n$), básico (x) y los cariotipos. Adicionalmente se analizó la metafase I y anafase I de la microsporogénesis de *C. incana* obteniendo el número gamético (n), los tipos y promedio de bivalentes por metafase I, el promedio de quiasmas por núcleo y el índice de recombinación. En el análisis meiótico de anafase I se detectaron irregularidades meióticas relacionadas con la segregación cromatídica, siendo puentes simples sin fragmento acéntrico.

Los números cromosómicos de las cuatro especies fueron: $2n=16$ en *C. spectabilis*, $2n=32$ en *C. longirostrata* y *C. pumila* y $2n=14$ en *C. incana*. En tejido somático de *C. pumila* y *C. incana* se observaron células poliploides con $8x=64$ y $4x=28$ cromosomas respectivamente.

Los números cromosómicos observados en el presente estudio, permiten considerar a *Crotalaria* género dibásico conformado por los números $x=8$ y $x=7$.

Las formulas cariotipicas de las cuatro especies fueron: $10m+6sm$ en *C.spectabilis*, $20m+10sm+2st$ en *C.longicastrata*, $16m+12sm+4st$ en *C.pumila* y $8m+6sm$ en *C.incana*, observándose variación en el número, forma, posición y tipo de las dobles constricciones inter e intraespecíficamente inclusive. En este sentido las variaciones fueron más notorias en *C.incana*, en la cual se observaron diferente número de dobles constricciones entre las poblaciones analizadas, aspecto que se reflejó en el comportamiento meiótico en metafase I y la viabilidad del polen.

INTRODUCCION

Las características geográficas de México, particularmente la topografía y fisiografía, han sido una condición importante que ha propiciado la diferenciación entre poblaciones de la misma especie, al originar gran cantidad de microclimas y al actuar como barreras geográficas generando aislamiento entre las poblaciones. Esta situación, no sólo ha sido importante para dar lugar a la gran diversidad de plantas y animales que caracterizan a nuestro país, sino también al propiciar la diferenciación de elementos culturales entre los grupos poblacionales o etnias. A la vez, esta diversidad cultural presente en México, ha influido de manera a veces determinante en la selección de las variedades vegetales que son empleadas, así como en su utilización y conservación (Montes, 1978).

La mayoría de las plantas que han sido utilizadas de manera tradicional, presentan cierta variabilidad genética resultado de la selección a la que han sido sometidas y la cual es importante para el desarrollo de su potencial como recurso (Caballero, 1985).

En estos términos, los estudios cromosómicos, que incluyen el análisis de los cromosomas durante la mitosis y la meiosis, contribuyen al conocimiento biológico de los recursos genéticos mediante el estudio de la variabilidad y la determinación de la base genética de los mismos. Conocer

la variabilidad genética y determinar su estabilidad, resulta primordial para poder llevar a cabo un programa en el campo del fitomejoramiento mediante la manipulación de los genotipos. A la vez, mediante los estudios cromosómicos es posible esclarecer la unidad genética de las especies, particularmente cuando se realizan en conjunción con estudios que permitan determinar la variación morfológica, anatómica, fisiológica o de las diferencias geográficas donde se desarrollan las especies, para de esta forma poder establecer el ordenamiento de los niveles taxonómicos (Palomino, 1986).

El conocimiento de los cromosomas y de los mecanismos citológicos implicados en su comportamiento (mitosis y meiosis), así como los procesos de reproducción fueron comprendidos con suficiente amplitud antes del redescubrimiento de las leyes de Mendel. Incluso Wilson en 1896 cit. por Lacadena (1988) recopila y sistematiza las ideas que se tenían en esa época sobre la Citología y la Embriología, poniendo de manifiesto lo que tiempo después habría de demostrar la Teoría Cromosómica de la Herencia, cuyos puntos esenciales son:

- 1- los genes están situados en los cromosomas,
- 2- su ordenación sobre los mismos es lineal y
- 3- al fenómeno de recombinación genética le corresponde un evento citológico de intercambio de segmentos cromosómicos.

Las primeras ideas de la Teoría Cromosómica, aparecen de manera simultánea y planteadas independientemente por Sutton

y Boveri en 1902 (Hipótesis de Sutton-Boveri), en cuyos trabajos correlacionan observaciones citológicas con genéticas (Lacadena, 1988).

Después de que Sutton y Boveri expusieron su teoría, se llevó a cabo una aportación de información experimental que contribuyó a confirmar la Teoría Cromosómica de la Herencia. La mayor parte de dicha confirmación correspondió a Morgan y colaboradores en 1910, al inferir la relación entre un gen y un cromosoma en particular, analizando genéticamente la mutación "White", que produce pigmentación blanca en el ojo de *Drosophila melanogaster*, análisis que posteriormente fue demostrado citológicamente por Bridges (1916), quien determina que el gen "White" se localiza en el cromosoma sexual X de dicho organismo (Lacadena, 1988).

Actualmente la Citogenética conserva su enfoque inicial, de resolver problemas basados en la correlación de las características citológicas y genéticas, con particular énfasis en las cromosómicas, que caracterizan al sistema particular de estudio. Comprendiendo en forma esencial, el análisis cromosómico durante la mitosis y la meiosis, así como su origen y relación con la transmisión de los genes. Análisis cromosómico que en algunos casos permite conocer la variabilidad genética y las relaciones evolutivas de los taxa (Rieger et al. 1982; Lacadena, 1988).

El Cariotipo

El término cromosoma designado por Waldayer en 1888 (cit. por Whitehouse, 1980) corresponde a una estructura de ligamiento, constituida por una secuencia específica de genes, los cuales determinan las características genotípicas y fenotípicas de los organismos (Rieger *et al.* 1982). En mitosis el conjunto de características de los cromosomas, es decir, su forma, longitud y número, clasificados de manera sistemática y ordenados en parejas de homólogos, constituye un cariotipo. Dichas características, son similares generalmente en las poblaciones y entre especies relacionadas. La similitud cariotípica incrementa la probabilidad de entrecruzamiento, ya que las posiciones relativas de los centrómeros y el arreglo lineal de sus genes es importante para que ocurra la sinapsis (Kenton, 1986; Lacadena, 1988).

Estudios sobre la morfología de los cromosomas son realizados en el paquiteno de la meiosis donde se observan los patrones cromoméricos específicos de cada cromosoma (Gupta y Gupta, 1978b), particularmente en maíz, alfalfa, centeno o tomate, sin embargo no todas las plantas presentan paquitenos adecuados para estos estudios (García, 1988), de ahí, que la mayoría de las caracterizaciones cariotípicas se realicen en metafase mitótica, donde se logra una contracción ideal de los cromosomas mediante la utilización de mitostáticos como la Colchicina o la 8-Hidroxiquinoleína,

los cuales hacen posible analizar la forma, longitud y el número de los cromosomas (John, 1976).

Los cromosomas en metafase mitótica están constituidos por dos cromátidas idénticas que pueden estar enrolladas plectonómicamente o bien permanecer paralelas. En general, la forma de los cromosomas está determinada por la posición del centrómero, el cual es un estrangulamiento visible al microscopio óptico en los cromosomas, denominado también constricción primaria o cinetocoro. En el centrómero, convergen las fibras del huso durante la división celular, en este sentido, el centrómero divide al cromosoma en dos brazos o bien puede ser terminal (Rieger et al. 1982; Lacadena, 1988).

Según la posición del centrómero, Levan et al. (1964) clasifican a los cromosomas en:

1- Metacéntricos, cuando el centrómero divide al cromosoma en dos brazos aproximadamente iguales,

2- Submetacéntricos, cuando se observan diferencias en la longitud de los brazos cromosómicos, pero ésta no es excesiva,

3- Subtelocéntricos, también conocidos como Acrocéntricos, en este tipo de cromosomas uno de los brazos es mucho más corto que el otro y

4- Telocéntricos, en los cuales el centrómero tiene una posición terminal.

Sin embargo en la metodología propuesta por Levan et al. (1964) no se considera a los satélites al clasificar los cromosomas. En este sentido, Naranjo et al. (1986) señalan que el satélite como parte integrante de los cromosomas,

debe incluirse al clasificarlos y proponen una plantilla que permite la clasificación de los cromosomas de plantas, sin la necesidad de medirlos. Este método sin embargo, sigue los criterios señalados por Levan et al. (1964), pero con la alteración que pueda involucrar en la clasificación cromosómica el segmento correspondiente al satélite.

La importancia que se les atribuye a los satélites, radica en que son estructuras que pueden ser utilizadas como marcadores cromosómicos, ya que se presentan de manera constante en cromosomas específicos (John, 1976).

En metafase mitótica los satélites son segmentos largos o cortos de un brazo cromosómico, separados del resto del mismo por una constricción delgada, la cual puede ser corta, como la del centrómero o larga como un filamento (García, 1988). Al respecto, Lacadena (1988) reconoce dos tipos de constricciones secundarias (c.s.): el primer tipo corresponde a las constricciones secundarias propiamente dichas, las cuales se observan al microscopio óptico como adelgazamientos en uno de los brazos cromosómicos, no llegando a constituir una separación de segmentos cromosómicos, cuya función o significado es desconocida. El otro tipo de constricción secundaria descrita por Lacadena (1988), corresponde a un adelgazamiento en uno de los brazos, separando generalmente del resto del cromosoma un segmento cromosómico denominado satélite, el cual puede variar en forma, tamaño y posición de una especie a otra. En

contraste de fases es posible observar una fibra cromatinica muy fina que une al satélite con el brazo cromosómico. Este tipo de constricción secundaria es la que se asocia de manera general a la región organizadora del nucléolo, estructura que se observa en el núcleo durante la interfase y profase, desapareciendo durante la metafase y formandose nuevamente hasta la telofase (Lacadena, 1988). La función del nucléolo se considera que está relacionada con la biosíntesis de ARN ribosómico (White, 1973).

Sin embargo, para determinar de manera precisa la asociación entre una constricción secundaria y el organizador nucleolar, es necesario utilizar nitrato de plata para determinar la actividad del organizador nucleolar en un cromosoma específico (Kenton *et al.* 1988).

El segundo tipo de constricción secundaria señalado por Lacadena (1988) es el más comúnmente observado en los complementos cromosómicos, presentando diferentes modalidades en relación a la forma, tamaño o posición de los satélites. En muchas ocasiones la constricción está cerca de la punta de un brazo y el satélite apenas es una esfera, como en *Pisum sativum*. Los satélites se encuentran generalmente sobre los brazos cortos y en un sólo par del complemento como en *Vicia faba*; sin embargo, existen excepciones para ambos aspectos. En *lens culinaris*, el satélite se encuentra en el brazo corto, pero es un segmento alargado de mayor longitud que el brazo al que está unido

(García, 1988) y en *Gibasis pulchella* presenta bisatélites, es decir satélites en los dos brazos de un sólo par cromosómico (Kenton *et al.* 1988).

Con la finalidad de distinguir los dos tipos de constricciones secundarias descritas por Lacadena (1988), en el presente estudio, se señalará el segundo tipo de constricción secundaria como satélite y el primero antes descrito como constricción secundaria (c.s.) y de manera amplia para referirse a ambos tipos se utilizará el término, dobles constricciones.

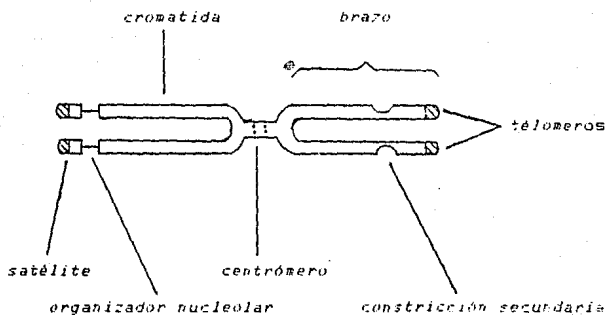


FIGURA 1. Características de un cromosoma mitótico en metafase (esquema tomado de: Lacadena, 1988).

La longitud de los cromosomas en metafase mitótica puede variar de una especie a otra, sin embargo, las longitudes más comunes son de 3 a 5 μm (García, 1988), en general los cromosomas pueden clasificarse de manera arbitraria en: largos con una longitud de más de 10 μm , medios entre 4 y 8 μm y cortos con menos de 2 μm (John, 1976).

En un complemento cromosómico normal cada par de homólogos presenta longitudes iguales, lo que permite establecer homología entre los cromosomas. Aún cuando, debe considerarse que la técnica citológica empleada, especialmente el pretratamiento, puede producir variación en la longitud de los cromosomas (Lacadena, 1988).

El número de cromosomas en las células es variable. La mayoría de las especies se caracteriza por presentar dos juegos idénticos de cromosomas en las células somáticas, de manera que el número de cromosomas es denotado como $2n$ (diploide), por estar formado por dos parejas de homólogos (Rieger et al. 1982).

Los conteos cromosómicos son a menudo la única información citogenética incorporada a estudios taxonómicos. Dando información en lo que se refiere al número básico (x), el cual representa el número monoploide más pequeño y frecuente de cromosomas de una serie poliploide y proporciona una idea de la similitud genética gruesa entre poblaciones y especies. Sin embargo, puede conducir a

consideraciones erróneas en lo que se refiere al grado de relación entre genotipos y taxa, cuando se presentan cambios estructurales, que generan variaciones en los números cromosómicos, por ello es necesario un muestreo adecuado entre y dentro de las poblaciones (Fenton, 1986).

En este sentido Stebbins (1971) considera que las 6 características que deben ser tomadas en cuenta para llevar a cabo un análisis cariotípico son:

- 1- longitud absoluta de los cromosomas,
- 2- posición del centrómero,
- 3- longitud relativa de los cromosomas,
- 4- número básico,
- 5- número y posición de los satélites,
- 6- grado y distribución de las regiones heterocromáticas y eucromáticas.

Citología de las Leguminosas

El conocimiento citológico en conjunción con estudios de Morfología externa, Anatomía, Palindología y análisis de ciertos componentes químicos, ha permitido plantear las tendencias generales de la evolución en las leguminosas (Goldblatt, 1981).

Se considera que las leguminosas actuales presentan un número básico $x=7$, originado a partir del $x=14$, el cual fue establecido tempranamente en su evolución, pudiendo haber

correspondido a un ancestro poliploide, que se originó como consecuencia de una fase inicial de poliploidia muy antigua que puede haber ocurrido en el Cretácico Tardío, cuando la mayoría de las leguminosas iniciaron su proceso de diferenciación, colonizando nuevos habitats (Goldblatt, 1981). Un primer ciclo de poliploidia es evidente en muchos grupos de Angiospermas primitivas (Stebbins, 1971), el cual puede correlacionarse con la creación de nuevos habitats, proceso seguido por cambios climáticos que acompañaron la formación del Océano Índico y la separación de África de América del Sur hace unos 130 a 125 millones de años (Raven, 1975).

El proceso citológico posterior, parece haber involucrado una disminución por aneuploidias en la mayoría de las líneas evolutivas, siendo particularmente pronunciadas en las Papilionoideas, donde las tribus y géneros de herbáceas presentan números básicos reducidos (Goldblatt, 1981).

Citología del Género *Crotalaria*

De las 550 especies que conforman al género *Crotalaria*, se han analizado citológicamente un total de 195 taxa a nivel mundial (Frahm-Leliveld, 1960; Miege, 1962; Magoon *et al.* 1963; Chennaveeraiah y Patil, 1970, 1972, 1973; Windler, 1971, 1973, 1974; Bhaumik, 1975; Fenandez, 1977; Gupta y Gupta, 1978a, 1978b; Raina y Verma, 1979; Verma *et al.* 1982, 1984; Verma y Raina, 1983; Ward, 1983; Husaini y Gill, 1985; Bairigajan y Patnaik, 1989), en los cuales se informan los

números cromosómicos $n=8$ ($2n=16$), $n=16$ ($2n=32$), $n=7$ ($2n=14$), $n=10$ y $n=21$. Presentándose de manera muy frecuente el $n=8$ ($2n=16$) en 169 taxa, siendo menos comunes los números $n=16$ ($2n=32$), $n=7$ ($2n=14$), $n=10$ y $n=21$, al presentarse en 19, 6, 3, y 1 taxa respectivamente. Se consideran constantes los números $n=8$, 16 y 7, en virtud de haberse encontrado de manera frecuente por diferentes investigadores, sin embargo existen discrepancias respecto del número $n=10$, el cual ha sido observado por Datta (1933), Datta y Mondal (1969) y Datta y Neogi (1965), para *C. falcata*, *C. dissitiflora* y *C. juncea*, sin embargo, Verma y Raina (1963) lo consideran erróneo, en virtud de no haberse encontrado dicho número en posteriores investigaciones, por el contrario se ha informado de manera general el $2n=16$ en *C. juncea*, por diferentes autores (Miege, 1962; Magdon et al. 1962; Bhatt, 1974, 1976; Bhaumik, 1975; Bir y Kumari, 1977; Gupta y Gupta, 1978b), en este sentido se atribuye el $n=10$ antes informado, a plantas aberrantes producto de manipulación en el laboratorio. En este sentido se considera únicamente la serie poliploide conformada por los números $n=8$, 16, 7 y 21 para el género *Crotalaria*, quedando fuera de consideración el $n=10$.

A partir del análisis de los números cromosómicos ha sido posible establecer el número básico primitivo para el género, siendo este el $x=8$ (ver discusión al final).

Los análisis cariotípicos llevados a cabo en el género son también amplios, aún cuando están conferidos a un grupo de especies en particular, en este sentido la mayor parte de la información comprende el análisis de la metafase mitótica, siendo pocos los trabajos en los que analizan los cariotipos en el paquiteno de la meiosis (Gupta y Gupta, 1978b), sin embargo en ambos casos coinciden en informar cariotipos conformados por cromosomas metacéntricos y submetacéntricos y sólo en algunas especies se han señalado de 1 a 2 cromosomas subteloacéntricos por complemento (Raina y Verma, 1979), en este sentido los cariotipos en el género son considerados como primordialmente simétricos (Gupta y Gupta, 1978a).

Un aspecto relevante en los cariotipos de *Crotalaria*, son las dobles constricciones por su constancia en la mayoría de las especies, así como por su variación en cuanto a forma tamaño o posición en el cromosoma.

Existe información variable en la literatura sobre el número y naturaleza de los cromosomas con dobles constricciones (satélites o constricciones secundarias). Chennaveeraiah y Patil (1973) han encontrado c.s. y satélites, Srivastava (1958) ha encontrado únicamente satélites, mientras que Magoon et al. (1963) no han observado dobles constricciones en las especies de *Crotalaria* analizadas por ellos. El número de dobles constricciones en el complemento diploide ($2n=16$) también

varia, observándose tres pares en *C. shevaroyensis*, dos en *C. brownei*, *C. saltiana*, *C. grahamiana* y uno en *C. barkae*, *C. leschenaultii*, *C. orixensis* y *C. nightiana* (Srivastava, 1958; Chennaveeraiah y Patil, 1973). No obstante de manera general son señalados sólo un par de satélites asociados con el organizador nucleolar, localizados en el par de cromosomas más largos (Sybenga, 1960 y Raina y Verma, 1979). Así mismo, las dobles constricciones varían en forma y posición en los diferentes taxa estudiados. En este sentido Raina y Verma (1979) distinguen tres categorías dentro del género. La primera comprende aquellos cromosomas en los cuales el centrómero y la constricción, están separados por un pequeño brazo cromosómico, presentando un satélite muy grande, como en *C. grahamiana*, *C. incana*, *C. lanceolata*, *C. brevifolia* y *C. burhia*; la segunda categoría es donde el satélite es un segmento esférico y pequeño comparado con el brazo cromosómico, observándose en *C. berrucosa* y *C. pallida*, y la tercer categoría es en la cual la constricción separa a dos segmentos iguales en longitud, como en *C. brownei*.

Taxonomía del Género *Crotalaria* L.

El género *Crotalaria* L. está constituido por aproximadamente 550 especies distribuidas en climas tropicales y subtropicales, es particularmente numeroso en África, donde se conocen más de 400 especies (Polhill, 1968). En América se considera que existen 89 especies

(Bernal, 1986), particularmente en Norteamérica se informa de la existencia de 31 especies, 21 de las cuales son consideradas nativas de México y las Indias Occidentales (Senn, 1939).

El Este de Africa y particularmente Madagascar son considerados los primeros y más importantes centros de diversificación del género, esto es por el gran número y diversidad de especies con que cuentan. Sin embargo, otros centros importantes están ubicados en la India con 80 a 90 especies (Magoon et al. 1963) y un tercer centro de diversificación, pero no menos importante, se encuentra en el Este del Nuevo Mundo. Este lugar alberga especies con características muy particulares (respecto de las demás especies del género): autogamia y la presencia de la poliploidia como proceso citológico de especiación, observándose en la mayoría de las especies estudiadas el $n=16$ en tejido gamético o el $2n=32$ en tejido somático, que además son características raras o poco comunes en las especies africanas o asiáticas. Por lo cual, la caracterización de las especies americanas de *Crotalaria* resulta importante, si adicionalmente se considera que algunas de ellas son utilizadas en la alimentación humana o animal en México (Caballero, 1985).

Las especies de *Crotalaria* presentan una amplia tolerancia a las condiciones climáticas y edáficas, pero están limitadas por la aridez y frío en extremo. Así mismo,

parecen tener un alto requerimiento de luz, por lo cual están ausentes en los estratos interiores del bosque, pero son comunes en los claros, márgenes de ríos, laderas de montañas y pantanos, algunas son competitivas con la vegetación herbácea, pero se desarrollan mejor en lugares en los cuales el terreno ha sido alterado, tales como áreas desmontadas para el cultivo, márgenes de bosques, orillas de carreteras y campos baldíos. La gran mayoría son anuales y sufruticosas y muchas son pioneras (Bernal, 1986).

Las características de diagnóstico del género *Crotalaria* han sido descritas por Polhill (1968) a partir del análisis floral de gran número de especies. Tales características, considera Polhill (1968) que no son correlacionables invariablemente y la ausencia de una o dos de ellas es frecuente, en este sentido las características señaladas por este autor son:

- 1- estambres monadelfos, con la envoltura hendida,
- 2- anteras largas basifijas y cortas dorsifijas alternas,
- 3- estilo con una o dos líneas de pelos hacia el ápice,
- 4- ovario estipitado,
- 5- quilla en forma de pico,
- 6- alas con filas de dobleces de forma de media luna entre las venas superiores,
- 7- estandarte con una uña corta y con dos pequeños apéndices en la base,
- 8- cáliz con 5 (ó bien 4) lóbulos casi iguales, a veces con el lóbulo superior y los laterales coherentes o unidos casi hasta el ápice, con el tubo alargado en las caras superiores e inferiores, siendo en estos casos siempre los

l6bulos relativamente largos.

9- Las legumbres de la gran mayorfa de las especies son caracteristicamente infladas.

La distribuci6n geogr6fica y las caracteristicas morfol6gicas que permiten su determinaci6n taxon6mica, se muestran en el CUADRO 1.

Ubicaci6n Taxon6mica de las Especies Estudiadas

Las cuatro especies estudiadas en el presente trabajo se clasificaron de acuerdo a Heywood (1979) y Polhill (1968).

Familia: Leguminosae

Subfamilia: Papilionoideae

Tribu: Crotalarineae

Secci6n: Crotalaria

Subsecci6n: Crotalaria

Especie: *Crotalaria spectabilis* Roth.

Subsecci6n: Longirostres

Especies: *Crotalaria longirostrata* Arn. y Hook.

Crotalaria pusilla Ort.

Secci6n: Chrysocalicinae

Subsecci6n: Incanae

Especie: *Crotalaria incana* L.

CUADRO 1. DISTRIBUCION GEOGRAFICA Y CARACTERISTICAS MORFOLOGICAS DE LAS CUATRO ESPECIES DE Crotalaria ESTUDIADAS CROMOSOMICAMENTE EN LA PRESENTE INVESTIGACION.

ESPECIE	DISTRIBUCION	HABITO	HOJAS	INFLORES- CENCIAS	FLORES	FRUTO
<u>C. spectabilis</u>	Asia e introducida en las Indias Occ. y el Sur de E.U.A.	Hierba erecta o sub-arbusto de 0.4 a 2 m. de altura.	Simple de 3 cm. de largo, con estípulas anchas, obovadas y persistentes, no decurrentes al tallo.	Racimos terminales	Amarillas, de 1.5 a 2.5 cm. de largo. El cáliz es glabro.	Legumbre inflada estipitada con rucras semillas de color negro.
<u>C. longirostrata</u>	Sur de México y Centro-américa.	Hierba o arbusto erecto de hasta 1.5 m de altura. Con tallo redondo y glabro.	Trifoliadas con folíolos elípticos o ligeramente obovados de 0.5 a 1.5 cm. de largo.	Racimos largos terminales o subterminales.	Amarillas, largas con el rostro de la carina de 1.3 a 1.5 cm de largo y con la carina formando un ángulo recto y los lobulos del cáliz cortos.	Legumbre inflada no atenuada en la base y muy pubescente, de color café oscuro, con semillas de color café o beige.
<u>C. guila</u>	Sur de E.U.A. a Suramérica y las Indias Occ.	Hierba erecta o decumbente de 4 a 30 cm. de altura.	Trifoliadas con folíolos obovados de 0.7 a 1.5 cm. de largo.	Racimos terminales, subterminales o bien opuestos a las hojas.	Amarillas, pequeñas con el rostro de la carina de 0.6 a 1.1 cm. de largo, con el estandarte pubescente con la carina formando un ángulo recto.	Legumbre inflada, corta, atenuada en la base y pubescente. Presenta hasta 18 semillas de color café.
<u>C. incana</u>	Trópicos	Hierba anual de hasta 1 m. de altura, con el tallo redondo y muy piloso.	Trifoliadas con folíolos largos obovados u orbiculares de 1.8 a 6 cm. de largo.	Racimos largos, terminales o subterminales.	Amarillas, con el cáliz muy lobulado y el tubo del cáliz muy pequeño.	Legumbre inflada, densamente tomentosa con tricomas abundantes y atenuados en la base. El fruto es de color café y contiene hasta 20 semillas.

Importancia Etnobotánica del Género *Crotalaria*

La riqueza florística y la amplia tradición etnobotánica manifestada en México, se traduce en la existencia de 5000 a 7000 especies de plantas útiles, de las cuales 1000 a 1500 son comestibles. Con lo que se cuenta con un amplio espectro de recursos genéticos con valor potencial (Arellano, 1986).

Los recursos genéticos potenciales, son definidos por Hernández (cit. por Caballero, 1985), basándose en cuatro criterios:

- 1- son recursos que no se incluyen en los 20 o 30 complejos genéticos de plantas cultivadas de interés comercial,
- 2- sólo tienen interés regional,
- 3- son conocidos y manejados por las poblaciones rurales, bajo sus sistemas tradicionales de subsistencia,
- 4- presentan capacidad genética conocida pero aún no utilizada, parcial o totalmente para generar plantas útiles para el hombre, susceptibles de ser aprovechadas por sectores más amplios de la sociedad.

El caracterizar, evaluar, conservar y explorar dichos recursos resulta importante dada la gran variabilidad del plasma germinal nativo, que hasta ahora se le ha prestado poca o ninguna importancia. De ahí que el espectro de cultivos nativos utilizados sea reducido, teniendo cada vez menor importancia en relación a los cultivos foráneos, particularmente en el medio urbano (Martínez, 1984).

A partir del estudio de gran número de especies nativas de México ha sido posible conocer los contenidos de proteínas, vitaminas o minerales que presentan, siendo en la

mayoría de los casos muy altos (CUADRO 2). Adicionalmente algunas de ellas presentan una gran variabilidad genética, resultado en parte de su amplia distribución geográfica e importancia económica y cultural, tal como se manifiesta en los géneros *Amaranthus*, *Inga*, *Leucaena* y *Crotalaria*, lo cual hace de éstas plantas un recurso genético de interés para nuestro país (Caballero, 1985).

Las especies de *Crotalaria* son útiles para el hombre, como forraje, como fuente de fibras, como cobertura del suelo en el control de la erosión y como ornamentales, así mismo se señalan algunos usos en la medicina popular y en la alimentación humana (Bernal, 1986).

Un buen número de especies de *Crotalaria*, son conocidas comúnmente como "Chepiles" o "Chipilines", pero por lo general cada especie recibe un nombre particular en cada región del país.

El uso tradicional de los "Chepiles" se remonta a tiempos prehispánicos, siendo utilizadas como hortalizas, particularmente *C. longirostrata*, la cual es señalada por Hernández (1985) como una de las plantas cultivadas en Mesoamérica al igual que el *Amaranthus* spp. ("Quintonil"), *Chamaedorea tepejilote* ("Tepejilote"), *Leucaena* spp. ("Guaje"), *Lycopersicon esculentum* ("Jitomate"), *Opuntia* sp. y *Nopalea* sp. ("Nopales") o *Physalis ixocarpa* ("Tomate"). *C. longirostrata* es probablemente la especie más utilizada en la alimentación humana de todas las especies de *Crotalaria*,

CUADRO 2. ANALISIS BROMATOLOGICO DE Crotalaria longirostrata (BASE HUMEDA).

% DE DESGASTE	48.0
AGUA (ml.).....	81.8
PROTEINAS (gr. %)... ..	7.1
GRASA (gr.).....	1.0
CARBOHIDRATOS:	
Gramas Totales	8.7
Fibra Cruda (gr.).....	1.9
CENIZAS (gr.).....	1.4
CALCIO (mg.).....	248.0
FOSFORO (mg.).....	74.0
HIERRD (gr.).....	4.9
VITAMINA A (mg.).....	3.84
TIAMINA (mg.).....	0.33
RIVOFILAVINA (mg.).....	0.52
NIACINA (mg.).....	2.02
ACIDO ASCORBICO (mg.).....	112.0

TOMADO DE MARTINEZ (1984)

en este sentido se han llevado a cabo Análisis Bromatológicos para conocer los constituyentes que aporta la planta, siendo particularmente altos en relación al contenido de proteínas, Calcio, Fósforo y de la vitamina A, respecto de los presentados por otras hortalizas como se muestra en CUADRO 3 (Martínez, 1984). La planta de *C. longirostrata* es vendida en pequeños ramos en los mercados tanto en el sur de México como en Centroamérica. La mayoría de las plantas que son vendidas en los mercados, crecen espontáneamente en jardines o cultivos de maíz principalmente, aún cuando otras son cultivadas al igual que las hortalizas, los retoños verdes se cuecen y son consumidos al igual que las espinacas. Algunas otras especies son también utilizadas en la alimentación humana, como es el caso de *C. cajanifolia*, *C. incana*, *C. vitellina* y particularmente *C. pumila*, cuyas hojas tiernas son empleadas en la elaboración de tamales. Con fines medicinales también son empleadas algunas especies de *Crotalaria*, como es el caso de *C. sessiliflora* la cual es utilizada como suavizante de la piel, por su parte *C. indica* y en especial *C. incana* son consideradas buenos diuréticos y desinfectantes de heridas y llagas (Bernal, 1986), así mismo Windler y McLaughlin (1980) le atribuyen ciertas propiedades terapéuticas a *C. incana* en contra del cáncer.

Por otra parte, investigaciones realizadas en algunas especies de *Crotalaria* y *Medicago sativa* (Alfalfa) para evaluar su potencial como forraje en relación a la

CUADRO 3. COMPARACION DE ELEMENTOS NUTRITIVOS ENTRE ALGUNAS HORTALIZAS (BASE HUMEDA).

ESPECIE	PROTEINAS (gr.%)	VITAMINA A (mg)	FOSFORO (mg)	CALCIO (mg)
<u>Crotalaria longirostrata</u> ("CHEPIL")	7.1	3.843	74	248
<u>Amaranthus hybridus</u> ("BLEDO")	4.5	2.740	78	280
<u>Cucurbita pepo</u> ("CALABAZA")	4.8	0.970	113	116
<u>Erythrina rubrinervia</u> ("BERRO")	5.5	1.085	86	88
<u>Rhapanus sativus</u> ("RABAND")	0.9	-----	26	24
<u>Lactuca sativa</u> ("LECHUGA")	1.4	0.175	37	23
<u>Daucus carota</u> ("ZANAHORIA")	1.0	3.138	48	33
<u>Brassica oleracea</u> var. <u>botrytis</u> ("COLIFLOR")	3.1	0.010	55	30
<u>Brassica oleracea</u> var. <u>capitata</u> ("REPOLLO")	1.7	0.008	29	48

TOMADO DE MARTINEZ (1984)

producción de leche en ganado bovino, han indicado que *Crotalaria* es una planta de considerable valor alimenticio, equiparable a la "Alfalfa" (Bernal, 1986). Sin embargo, este alto valor nutritivo presente en algunas especies de *Crotalaria*, en ocasiones se ve asociado a compuestos secundarios que constituyen factores antinutricionales o tóxicos, como sucede en algunas especies, las cuales suelen presentar el alcaloide denominado Monocrotalina. La Monocrotalina se considera que es el principio tóxico en la planta y se ha encontrado en *Crotalaria spectabilis*, *C. retusa*, *C. burkeana*, *C. dura*, *C. strigillosa*, *C. globifera* y *C. juncea*. El alcaloide se ha aislado de *C. spectabilis*, presentando una fórmula empírica de $C_{16}H_{26}O_4N_2$. Su toxicidad se ha informado en Florida y Georgia en los Estados Unidos de América, donde *C. spectabilis*, ha sido utilizada como abono verde y al ser consumida casualmente por aves y otros animales, les ha causado graves intoxicaciones o la muerte (Adams y Rogers, 1937). Así mismo, en la India, Afganistan y Sri Lanka, se han presentado enfermedades renales y hepáticas en personas que han consumido las semillas o la planta de *C. juncea*. Encontrándose en la planta un alcaloide del tipo Pirrolizidinico, el cual se considera que tiene acción como agente alquilante con actividad carcinogénica. Se ha demostrado que el consumo de la planta es la causa principal de hepatomas, aún cuando también se sabe que puede incorporarse al organismo por absorción cutánea, a través de

la placenta y por ingestión de la leche materna en los niños. Análisis realizados en dicho compuesto, utilizando aves como animal de experimentación, han proporcionado información sobre la dosis mínima letal, siendo esta de 65 mg/kg. de peso vivo (Arseculeratne et al. 1984).

El presente estudio se llevó a cabo en diez poblaciones de cuatro especies del género *Crotalaria*, siendo *C. spectabilis* Roth., *C. longirostrata* Arn. y Hook., *C. pumila* Ort. y *C. incana* L. colectadas en Veracruz, Guerrero, Puebla, el Distrito Federal, Hidalgo, Tabasco y Chihuahua con la finalidad de:

- Determinar los números cromosómicos somático y básico, así como los niveles de ploidía.

- Elaborar los cariotipos de cada una de las especies, para establecer similitudes y diferencias interespecíficas.

- Determinar el patrón de comportamiento meiótico de cuatro poblaciones de *C. incana*, analizando los tipos de bivalentes, el promedio de quiasmas por núcleo y el índice de recombinación en metafase I, así como la distribución cromosómica en anafase I de cada una de ellas.

- Proponer en base a estos estudios los posibles mecanismos cromosómicos involucrados en la evolución de las cuatro especies analizadas en el presente estudio.

- Proporcionar información Citológica para integrar estudios taxonómicos, biosistemáticos y filogenéticos en *Crotalaria*.

MATERIALES Y METODOS

Las plantas en las que se llevó a cabo el presente estudio fueron colectadas en Veracruz, Guerrero, el Distrito Federal, Puebla, Hidalgo, Tabasco y Chihuahua (CUADRO 4 y FIG. 2), mismas que fueron integradas a la colección de plantas vivas del Jardín Botánico del Instituto de Biología (UNAM), los ejemplares de herbario correspondientes se depositaron en el Herbario Nacional (MEXU), lugar donde se determinaron los materiales.

El estudio de células en metafase mitótica se llevó a cabo en meristemos apicales obtenidos de las raíces secundarias de las plantas. Se eligieron las raíces que presentaron una longitud de 1.5 a 2 cm., cortándose de 7 a 8 AM., para ser pretratadas en la solución acuosa de 8-hidroxiquinoleína a una concentración 0.002 M., manteniéndose a 18°C y en la oscuridad, durante 5 hrs. Posteriormente se lavaron con agua destilada y se fijaron en la mezcla Farmer, alcohol etílico y ácido acético glacial, 3:1 (v/v).

Para tefir los cromosomas, se hidrolizaron las raíces con HCl a concentración 1 N a 60°C durante 10 min., después se depositaron en solución acuosa Feulgen. Una vez que el meristemo apical adquirió una coloración violeta, se depositó en un portaobjetos, agregando aceto-orceína al 1%, procediendo a la separación y aplastamiento del tejido mediante un lápiz, para su observación al microscopio óptico en campo claro.

CUADRO 4. DATOS DE COLECTA DE LAS CUATRO ESPECIES DE Crotalaria ESTUDIADAS CROMOSOMICAMENTE.

ESPECIE	NO. DE COLECTA	COLECTOR	LOCALIDAD Y AÑO DE COLECTA
<u>C. spectabilis</u> Roth.	11	SINTA	Km. 36 de la carretera Catemaco a Montepio, VERACRUZ. 1987
<u>C. spectabilis</u> Roth.	16	SINTA	Balzapote, Mpio. San Adrés Tuxtla, VERACRUZ. 1988.
<u>C. longirostrata</u> Arn. y Hook	84	VAZQUEZ	Km. 29 a Filo de Caballo de la carretera a Acapulco, GUERRERO. 1988.
<u>C. pumila</u> Ort.	S.N.	VAZQUEZ	Pedregal de San Angel, Distrito Federal. 1987.
<u>C. pumila</u> Ort.	S.N.	CASAS	Joya del Limón, Mpio. de Alcozauca, GUERRERO. 1984, 1987.
<u>C. pumila</u> Ort.	15914	BYE	Camino a San Miguel Tianguisolco, W. de Huejotzingo, PUEBLA. 1986.
<u>C. incana</u> L.	28	SINTA	La Palma, Mpio. de Catemaco, VERACRUZ. 1988.
<u>C. incana</u> L.	63	VAZQUEZ	Km. 51 de la carretera de Atotonilco a Molango, HIDALGO. 1988.
<u>C. incana</u> L.	1734	CABALLERO	Ayala, Mpio. del Paraíso, TABASCO. 1986.
<u>C. incana</u> L.	16542	BYE	La Bufa, Mpio. de Batopilas CHIHUAHUA. 1988.



- *C. spectabilis*
- * *C. longirostrata*
- *C. pumila*
- ◻ *C. incana*

FIGURA 2. Localización en México de las cuatro especies de *Crotalaria* estudiadas cromosómicamente.

Las preparaciones donde se observaron células con cromosomas metafásicos, nítidos y separados, se hicieron permanentes por el método del "hielo seco", propuesto por Conger y Fairchild (1953).

De cada población constituida por 4 a 12 plantas se analizaron 20 células, las mejores 2 células representativas de cada población se fotografiaron en un Fotomicroscopio Zeiss III a 100X 1.25, asa 100, con película Technical Pam, mismas que fueron reveladas con la solución líquida reveladora NC110. De los negativos así obtenidos se imprimió en papel Ildford MG-1, mediante la solución líquida reveladora ID62.

Los cromosomas de las células seleccionadas se dibujaron mediante la proyección de los negativos con un proyector de transparencias. A partir de los dibujos y de las fotografías así obtenidas, se elaboraron los cariotipos. Los cromosomas dibujados se homologaron conforme a las longitudes absoluta (μm) de los brazos cortos y largos y la longitud total de cada par cromosómico, así como también se consideraron otros parámetros, como la relación de brazos (R.B.) dada por el cociente del brazo largo entre el corto de cada cromosoma, también se determinaron la longitud relativa porcentual (L.R.) de acuerdo a García (1988) y el índice de asimetría (TF%) de acuerdo a Gupta y Gupta (1978). Todos estos parámetros permitieron ordenar los cromosomas del más largo al más corto, en forma progresiva a partir del número uno para el cromosoma más largo. La clasificación de los

cromosomas fue conforme al método gráfico propuesto por Naranjo *et al.* (1986), que está de acuerdo a la clasificación de Levan *et al.* (1964).

Los idiogramas de las cuatro especies estudiadas se elaboraron para el complemento haploide, a partir de las longitudes absolutas de los cromosomas de cada complemento cromosómico y fueron ordenados en forma decreciente en longitud, siendo el primer cromosoma el más largo y el último el de menor longitud.

El análisis de cromosomas meióticos en metafase I (MI) y anafase I (AI), se llevó a cabo en células madres del polen (CMP) de anteras frescas obtenidas de botones florales jóvenes, mediante un microscopio estereoscópico. Para este análisis se muestrearon entre 3 y 5 plantas que florecieron en los invernaderos del Jardín Botánico, correspondientes a cuatro poblaciones de *C. lucana* y una de *C. punila* (de Guerrero). De cada planta se cortaron las anteras y se colocaron en un portaobjetos, agregando aceto-orceína al 1%, para poder separar el tejido y así observar los cromosomas en un microscopio en campo claro. Las preparaciones así obtenidas se hicieron permanentes por el método propuesto por Conger y Fairchild (1953).

De cada población se analizaron entre 30 y 31 células en MI y entre 123 y 452 en AI. De esta forma se determinaron los tipos de bivalentes y el promedio de quiasmas por núcleo, así como el índice de recombinación (I.R.) para cada población.

El promedio de quiasmas por núcleo de cada población analizada se obtuvo sumando el total de quiasmas y dividiendolo entre el total de núcleos muestreados, según lo propuesto por Sáez y Cardoso (1978) y el índice de recombinación se obtuvo sumando el número de bivalentes por núcleo con el promedio de quiasmas por núcleo según White (1973).

Finalmente se estimó el porcentaje de viabilidad del polen de tres de las poblaciones de *C. incana* (de Hidalgo, Veracruz y Chihuahua) mediante la utilización del colorante azul de algodón, tomando una muestra de 9 a 22 flores de 3 a 5 plantas de las tres poblaciones estudiadas. El criterio seguido para este análisis fue: coloración azul intensa de granos de polen esféricos, se consideraron viables y ausencia de coloración y/o polen deforme (media luna) como no viables.

Con la finalidad de determinar si las diferencias observadas entre las poblaciones analizadas en el presente estudio, en relación a los parámetros: promedio de quiasmas por núcleo, índice de recombinación y promedio de viabilidad del polen son significativamente diferentes o bien las diferencias son debidas al azar, se utilizó como regla de decisión el Ensayo Bilateral "t de Student".

RESULTADOS

Se estudiaron diez poblaciones de cuatro especies del género *Crotalaria* colectadas en Veracruz, Guerrero, el Distrito Federal, Puebla, Hidalgo, Tabasco y Chihuahua (CUADRO 4 y FIG. 2).

Las cuatro especies estudiadas presentaron los números cromosómicos de $2n=16$ en *C.spectabilis*, $2n=32$ en *C.longirostrata* y *C.pumila* y $2n=14$ en *C.incana* (FIG. 3).

Al analizar las longitudes absolutas se observaron diferencias entre las cuatro especies, presentando cromosomas largos; *C.incana* y *C.spectabilis* y cromosomas pequeños; *C.longirostrata* y *C.pumila* (TABLA 1). De las cuatro especies la que presentó los cromosomas más largos fue *C.incana*, con un rango de longitud del cromosoma más pequeño al más largo de 2.53 a 3.93 μm (para las cuatro poblaciones estudiadas), menor longitud cromosómica se observó en *C.spectabilis* con un rango de 2.34 a 3.20 μm y los cromosomas más pequeños fueron los de *C.longirostrata* con un rango de 1.12 a 1.66 μm y los de *C.pumila* con 1.06 a 1.79 μm .

Sin embargo, las diferencias observadas en las longitudes cromosómicas de las cuatro especies, no se reflejaron en las longitudes totales de cromatina (LTC), dado que éstas fueron similares entre las cuatro especies, siendo *C.incana* la que

presentó la LTC más alta con 21.61 μm y por su parte *C. longirostrata* presentó la menor LTC con 20.44 μm .

A partir de la longitud relativa porcentual obtenida para cada especie (TABLA I), se ordenaron los pares cromosómicos en forma decreciente de longitud y numerados progresivamente, partiendo del uno para el par más largo (FIG. 6 y 7). En este sentido, una característica constante de las cuatro especies fue el presentar en la posición uno del cariotipo, al cromosoma con satélite.

La morfología cromosómica determinada por la posición del centrómero fue establecida de acuerdo a la clasificación de Naranjo *et al.* (1986). En este sentido, las cuatro especies presentaron cromosomas principalmente metacéntricos o submetacéntricos, siendo únicamente *C. longirostrata* y *C. punila*, las especies que presentaron cromosomas subtelocéntricos (TABLA II y FIG. 3), de manera que no se observaron cromosomas telocéntricos en las especies estudiadas en el presente trabajo.

Los cariotipos de las cuatro especies estuvieron constituidos por 10m + 6sm en *C. spectabilis*, 20m + 10sm + 2st en *C. longirostrata*, 16m + 12sm + 4st en *C. punila* y 8m + 6sm en *C. incana*. Al considerar la proporción de cromosomas metacéntricos, submetacéntricos y subtelocéntricos, el cariotipo más simétrico de las cuatro especies, fue el de *C. spectabilis* (FIGS. 6A y 7A), presentando el índice de

asimetría (TF%) más alto con 41.83%. Por el contrario *C. pumila* presentó el cariotipo menos simétrico, al contar con el mayor número de submetacéntricos y subtelocéntricos, aspecto que originó el índice de asimetría más bajo, siendo de 38.01%. Los índices de asimetría intermedios se observaron en *C. longirostrata* con un 41.68% y en *C. incana* con un 40.55% (para las cuatro poblaciones).

Se observaron diferencias en el número, forma, posición y tipo de las dobles constricciones entre los complementos cromosómicos de las cuatro especies y entre las poblaciones de *C. incana*.

En el cariotipo de *C. spectabilis* (TABLA II y FIGS. 6A y 7A) se observaron dos pares de metacéntricos con satélites:

El par 1, tuvo satélites en forma de segmentos alargados y con mayor tamaño que los brazos cortos a los que estaban unidos.

El par 4 presentó satélites esféricos y pequeños en los brazos largos.

Por su parte *C. longirostrata* presentó un cariotipo (TABLA II, FIG. 6B y 7B) con satélites en los brazos cortos del par submetacéntrico 1.

El cariotipo de *C. pumila* (TABLA II, FIGS. 6C y 7C) presentó satélites esféricos y pequeños en los brazos cortos del par metacéntrico 1.

asimetría (IFX) más alto con 41.83%. Por el contrario *C. pumila* presentó el cariotipo menos simétrico, al contar con el mayor número de submetacéntricos y subteloacéntricos, aspecto que originó el índice de asimetría más bajo, siendo de 38.01%. Los índices de asimetría intermedios se observaron en *C. longirostrata* con un 41.68% y en *C. incana* con un 40.55% (para las cuatro poblaciones).

Se observaron diferencias en el número, formas, posición y tipo de las dobles constricciones entre los complementos cromosómicos de las cuatro especies y entre las poblaciones de *C. incana*.

En el cariotipo de *C. spectabilis* (TABLA II y FIGS. 6A y 7A) se observaron dos pares de metacéntricos con satélites:

El par 1, tuvo satélites en forma de segmentos alargados y con mayor tamaño que los brazos cortos a los que estaban unidos.

El par 4 presentó satélites esféricos y pequeños en los brazos largos.

Por su parte *C. longirostrata* presentó un cariotipo (TABLA II, FIG. 6B y 7B) con satélites en los brazos cortos del par submetacéntrico 1.

El cariotipo de *C. pumila* (TABLA II, FIGS. 6C y 7C) presentó satélites esféricos y pequeños en los brazos cortos del par metacéntrico 1.

Las cuatro poblaciones de *C. incana* presentaron la misma fórmula cariotípica constituida de $8m + 6sm$, sin embargo se detectó variación en el número, forma, posición y tipo de las dobles constricciones entre las poblaciones analizadas, de manera que se presentan dos cariotipos para *C. incana*, el cariotipo A (FIG. 6D), correspondiente a las poblaciones de Veracruz, Hidalgo y Tabasco y el cariotipo B (FIG. 6E) de la población de Chihuahua. A continuación se señalan las características de ambos cariotipos en relación al número, forma, posición y tipo de las dobles constricciones:

Cariotipo A

Presentó satélites en los pares cromosómicos 1, 2 y 5 (FIGS. 3D, 3E y 6D).

En el par metacéntrico 1; se observó un satélite alargado de mayor tamaño que el brazo corto al que estaba unido.

El par metacéntrico 2, presentó un satélite esférico y pequeño en el brazo corto.

Y el par submetacéntrico 5, presentó un satélite esférico y pequeño en el brazo largo.

Cariotipo B

Por su parte el cariotipo de la población de Chihuahua de *C. incana* (TABLA II, FIG. 6E y 7E) presentó cuatro dobles constricciones en los pares cromosómicos 1, 2, 3 y 5 (FIG. 3F).

El par metacéntrico 1 y submetacéntrico 5, presentaron la misma forma y posición de los satélites del cariotipo A (descrito previamente).

Sin embargo, en el par metacéntrico 2, fueron satélites esféricos y pequeños, pero se presentaron en los brazos largos y no en los cortos, como en el cariotipo A.

Adicionalmente en el par metacéntrico 3, se presentó una constricción secundaria, clasificada así, de acuerdo a las diferencias señaladas previamente (en la Introducción) entre satélites y constricciones secundarias.

Por otra parte, se observaron células poliploides de manera constante pero en bajo número en tejido somático de *C. pumila* y *C. incana*.

En *C. pumila* se presentaron células octoploides con $8x=64$ (FIG. 4A) con una frecuencia del 3.7% entre células con $4x=32$ y por su parte en *C. incana* fueron células tetraploides con $4x=28$ (FIG. 4B) con una frecuencia del 4.7% entre células con $2x=14$. Aún cuando en ambas especies se presentaron de manera constante las células poliploides, siempre constituyeron la menor parte del tejido, de manera que la parte fundamental del mismo siempre estuvo constituida de células con $4x=32$ en *C. pumila* y $2x=14$ en *C. incana*.

El análisis meiótico se llevó a cabo en las células madres del polen (CMP) en metafase I (MI) y anafase I (AI) de cuatro poblaciones de *C. incana* y en la MI de una población (de Guerrero) de *C. pumila*, en virtud de haber sido las únicas que florecieron en el invernadero del Jardín Botánico.

Sin embargo, en el par metacéntrico 2, fueron satélites esféricos y pequeños, pero se presentaron en los brazos largos y no en los cortos, como en el cariotipo A.

Adicionalmente en el par metacéntrico 3, se presentó una constricción secundaria, clasificada así, de acuerdo a las diferencias señaladas previamente (en la Introducción) entre satélites y constricciones secundarias.

Por otra parte, se observaron células poliploides de manera constante pero en bajo número en tejido somático de *C.pumila* y *C.incana*.

En *C.pumila* se presentaron células octoploides con $8x=64$ (FIG. 4A) con una frecuencia del 3.7% entre células con $4x=32$ y por su parte en *C.incana* fueron células tetraploides con $4x=28$ (FIG. 4B) con una frecuencia del 4.7% entre células con $2x=14$. Aún cuando en ambas especies se presentaron de manera constante las células poliploides, siempre constituyeron la menor parte del tejido, de manera que la parte fundamental del mismo siempre estuvo constituida de células con $4x=32$ en *C.pumila* y $2x=14$ en *C.incana*.

El análisis meiótico se llevó a cabo en las células madres del polen (CMP) en metafase I (MI) y anafase I (AI) de cuatro poblaciones de *C.incana* y en la MI de una población (de Guerrero) de *C.pumila*, en virtud de haber sido las únicas que florecieron en el invernadero del Jardín Botánico.

La muestra analizada de *C. pumila* en MI de meiosis, permitió únicamente hacer consideraciones sobre el tamaño y organización de los cromosomas, los cuales formaron en MI asociaciones de 16 bivalentes exclusivamente, siendo estos pequeños impidiendo la determinación del tipo y número de quiasmas.

En *C. incana* el análisis meiótico permitió determinar los tipos de bivalentes por cada CMP, siendo de dos tipos: bivalentes formado anillos (a) y formando cadenas (c), dado que la posición de los quiasmas en los bivalentes siempre fue terminal, los bivalentes en anillo presentaron dos quiasmas terminales y los bivalentes en cadena presentaron un quiasma terminal.

La proporción de bivalentes en anillo (a) y cadena (c) varió de una CMP a otra y de una población a otra (TABLA III) en general en las cuatro poblaciones de *C. incana* se observaron los dos tipos de bivalentes con un rango de 0 a 6 en anillo y de 1 a 7 en cadena (TABLA III).

El promedio de bivalentes en anillo y cadena fue diferente de una población a otra, siendo la tendencia central, el presentar 3 bivalentes en anillo y 4 en cadena, como se observa en el promedio de la población de Hidalgo con 2.92 a y 4.08 c, no siendo tan claro en las poblaciones de Veracruz con 2.68 a y 4.32 c o en la de Tabasco con 3.22 a y 3.78 c, sin embargo la que más se alejó del promedio fue la de Chihuahua con 2.52 a y 4.48 c.

Debido a que prácticamente todos los bivalentes presentaron quismas terminales, el coeficiente de terminalización fue uno, para las cuatro poblaciones.

El promedio de quismas por núcleo (PQN) y el índice de recombinación (IR) obtenidos de las cuatro poblaciones analizadas de *C. incana*, fueron diferentes de una población a otra (TABLA III), los valores más altos se observaron en la población de Tabasco con un PQN de 10.22 y un IR de 17.02 y los más bajos correspondieron a la población de Chihuahua con un PQN de 9.52 y un IR de 16.52. Al hacer el análisis estadístico utilizando un ensayo bilateral "T de Student", de las cuatro poblaciones de *C. incana*, en relación al PQN y el IR, se obtuvo diferencias significativas únicamente entre las poblaciones de Tabasco y la de Chihuahua, con un nivel de significación de 0.01. En estos términos, las diferencias observadas entre las demás poblaciones, se pueden considerar producto del azar.

En el análisis meiótico en anafase I (AI) de las cuatro poblaciones de *C. incana* se observaron altos porcentajes de CMP con segregación normal (7:7), como se muestra en la TABLA IV y FIG. 5F, los cuales fueron similares de una población a otra. Sin embargo se observaron algunas CMP con segregación anormal (FIG. 5G) particularmente puentes anáfasicos simples, sin fragmento acéntrico, teniendo los

porcentajes más altos la población de Tabasco con un 2.76% y la de Chihuahua con un 2.44% (TABLA IV).

Se analizó la viabilidad del polen de tres poblaciones de *C. incana* (de Veracruz, Hidalgo y Chihuahua) como se muestra en la TABLA IV, presentando la viabilidad del polen más baja la población de Chihuahua. Del análisis estadístico se obtuvieron diferencias significativas únicamente entre la población de Chihuahua con respecto de las de Veracruz e Hidalgo, con un nivel de significación de 0.01.

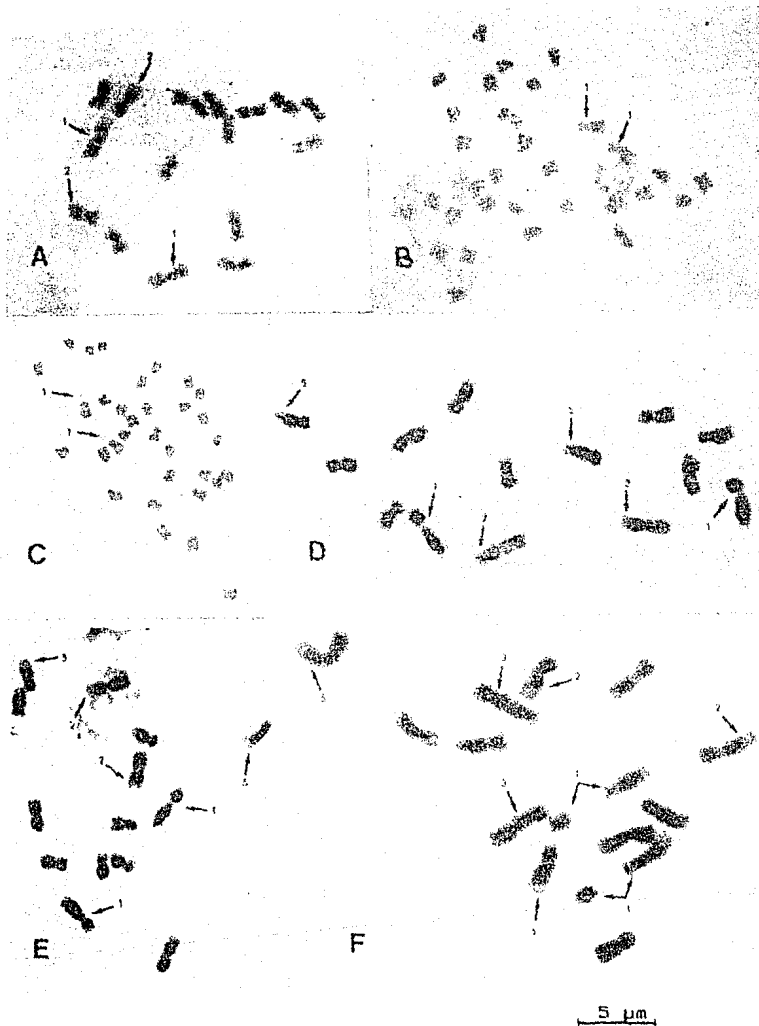


FIGURA 3. Cromosomas en metafase de células somáticas de 4 especies de *Crotalaria*. (A) *C. spectabilis*, $2n=16$; (B) *C. longirostrata*, $2n=32$; (C) *C. pusilla*, $2n=32$; (D - F) *C. incana*, $2n=14$: (D) Pob. de Veracruz, (E) Pob. de Tabasco y (F) Pob. de Chihuahua. Los números indican los cromosomas con dobles constricciones.

TABLA I. LONGITUDES CROMOSOMICAS PROMEDIO DE CUATRO ESPECIES DE *Crotalaria*.

ESPECIE	2p	P A R C R O M O S O M I C O																
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	
<i>C. spectabilis</i>	16	LONGITUD RELATIVA PORCENTUAL																
		LONGITUDES ABSOLUTAS (µm.)																
		1.82	1.75	1.77	1.51	1.38	1.60	1.48	1.19									
		1.38	1.25	0.98	1.15	1.27	0.92	0.88	1.16									
		1.20	3.01	2.75	2.66	2.65	2.52	2.35	2.34									
		RELACION DE BRAZOS (B.L./B.C.)																
		CLASIFICACION CROMOSOMICA																
		1.32	1.41	1.81	1.71	1.09	1.74	1.68	1.62									
		n	m	sm	n	n	sm	sm	n									
<i>C. longirostrata</i>	32	LONGITUD RELATIVA PORCENTUAL																
		LONGITUDES ABSOLUTAS (µm.)																
		1.06	0.35	0.80	0.72	0.84	0.70	0.64	0.93	0.62	0.84	0.78	0.64	0.60	0.75	0.60	0.75	0.75
		0.80	0.70	0.56	0.60	0.64	0.54	0.60	0.71	0.60	0.38	0.44	0.57	0.60	0.44	0.54	0.38	
		1.66	1.56	1.38	1.32	1.28	1.24	1.24	1.24	1.22	1.22	1.22	1.21	1.20	1.19	1.14	1.12	
		RELACION DE BRAZOS (B.L./B.C.)																
		CLASIFICACION CROMOSOMICA																
		1.77	1.23	1.38	1.28	1.00	1.36	1.07	3.00	1.03	2.21	1.77	1.12	1.00	1.70	1.11	1.95	
		sm	m	m	n	n	n	m	st	n	sm	sm	n	n	sm	n	sm	
<i>C. pusilla</i>	32	LONGITUD RELATIVA PORCENTUAL																
		LONGITUDES ABSOLUTAS (µm.)																
		0.97	1.17	0.98	1.07	0.76	0.75	0.80	0.82	0.69	0.79	0.64	0.78	0.66	0.78	0.60	0.54	0.54
		0.82	0.35	0.43	0.32	0.59	0.55	0.45	0.42	0.53	0.43	0.57	0.42	0.52	0.40	0.53	0.52	
		1.79	1.52	1.41	1.39	1.35	1.30	1.25	1.24	1.22	1.22	1.21	1.20	1.18	1.16	1.13	1.06	
		RELACION DE BRAZOS (B.L./B.C.)																
		CLASIFICACION CROMOSOMICA																
		1.18	3.28	2.26	3.34	1.29	1.36	1.78	1.95	1.36	1.84	1.77	1.12	1.00	1.70	1.11	1.95	
		a	st	sm	st	m	m	sm	sm	n	sm	m	sm	n	sm	m	a	
<i>C. incana</i> (e)	14	LONGITUD RELATIVA PORCENTUAL																
		LONGITUDES ABSOLUTAS (µm.)																
		2.18	2.00	1.75	1.99	1.93	1.63	1.85										
		1.77	1.64	1.48	1.01	1.06	1.14	0.86										
		3.95	3.64	3.23	3.00	2.99	2.77	2.71										
		RELACION DE BRAZOS (B.L./B.C.)																
		CLASIFICACION CROMOSOMICA																
		1.23	1.22	1.18	1.97	1.82	1.43	2.15										
		n	m	n	sm	sm	n	sm										
<i>C. incana</i> (*)	14	LONGITUD RELATIVA PORCENTUAL																
		LONGITUDES ABSOLUTAS (µm.)																
		2.34	2.25	1.69	1.85	1.79	1.48	1.48										
		1.58	1.50	1.48	1.09	0.89	1.05	0.87										
		3.92	3.75	3.17	2.94	2.68	2.53	2.35										
		RELACION DE BRAZOS (B.L./B.C.)																
		CLASIFICACION CROMOSOMICA																
		1.48	1.50	1.14	1.70	2.01	1.41	1.76										
		n	m	n	sm	sm	n	sm										

 NOTAS: (e) = POBLACIONES DE VERACRUZ, HIDALGO Y TABASCO
 (*) = POBLACION DE CHIHUAHUA

TABLA II. ANALISIS CARIOTIPICO DE CUATRO ESPECIES DE Crotalaria.

ESPECIE	2n	FORMULA CARIOTIPICA	DOBLES CONSTRIC.	LONGITUD RANGO	CROMOSOMICA TOTAL	(µm) ± 5	INDICE DE (TF%)
<u>C. spectabilis</u>	16	10n+6sn	2n	1.34 - 3.20	21.49	0.28	41.83
<u>C. longirostrata</u>	32	20n+10sn+2st	1sn	1.12 - 1.66	20.44	0.14	41.69
<u>C. pumila</u>	32	16n+12sn+4st	1n	1.06 - 1.79	20.65	0.17	38.01
<u>C. incana</u> (θ)	14	8n+6sn	2n+1sn	2.71 - 3.95	22.29	0.42	40.20
<u>C. incana</u> (*)	14	8n+6sn	3n+1sn	2.20 - 3.76	22.34	0.56	40.90

NOTAS: (θ) = POBLACIONES DE VERACRUZ, HIDALGO Y TABASCO

(*) = POBLACION DE CHIHUAHUA



FIGURA 4. Cromosomas en metafase de células somáticas poliploides de 2 especies de *Crotalaria*. (A) *C. pusilla*, 6x=64 y (B) *C. incana*, 4x=28. Los números indican los cromosomas con dobles constricciones.

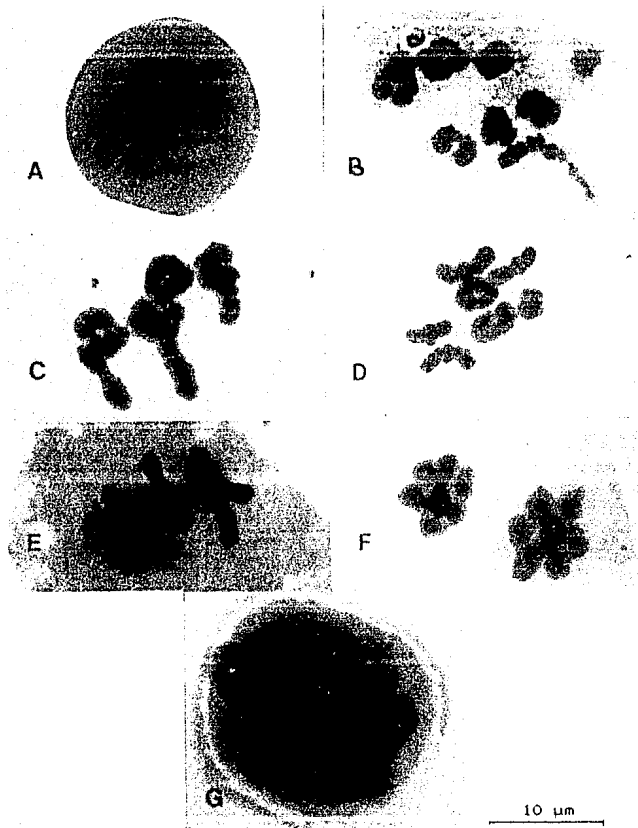


FIGURA 5. Células madres del polen en MI (A - E) y AI (F - G) de *Crotalaria pusilla* y *C. incana*. (A) *C. pusilla*, 16II; (B - E) *C. incana*, 7II, mostrando diferentes proporciones de bivalentes en anillo (a) y cadena (c). (B) 6a + 1c; (C) 4a + 3c; (D) 3a + 4c; (E) 2a + 5c. (F) Distribución regular de los cromosomas, 7:7, en AI y (G) Puente subcromatídico en AI.

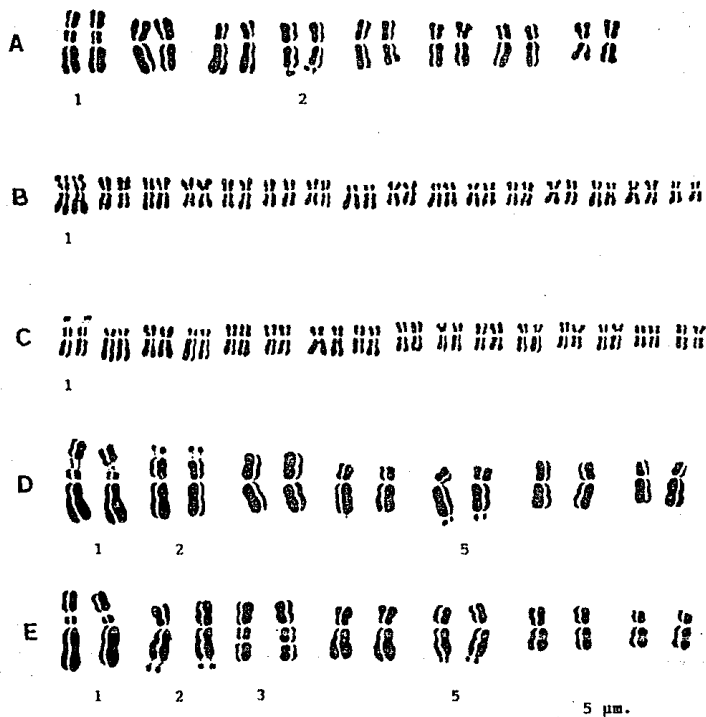


FIGURA 6. Cariotipos de cuatro especies de *Crotalaria*. (A) *C. spectabilis*, $2n=16$, $10m + 6sm$; (B) *C. longirostrata*, $2n=32$, $20m + 10sm + 2st$; (C) *C. pumila*, $2n=32$, $16m + 12sm + 4st$; (D - E) *C. incana*, $2n=14$, $8m + 6sm$; (D) Pops. de Veracruz, Hidalgo y Tabasco; (E) Pob. de Chihuahua. Los números indican los cromosomas con dobles constricciones.

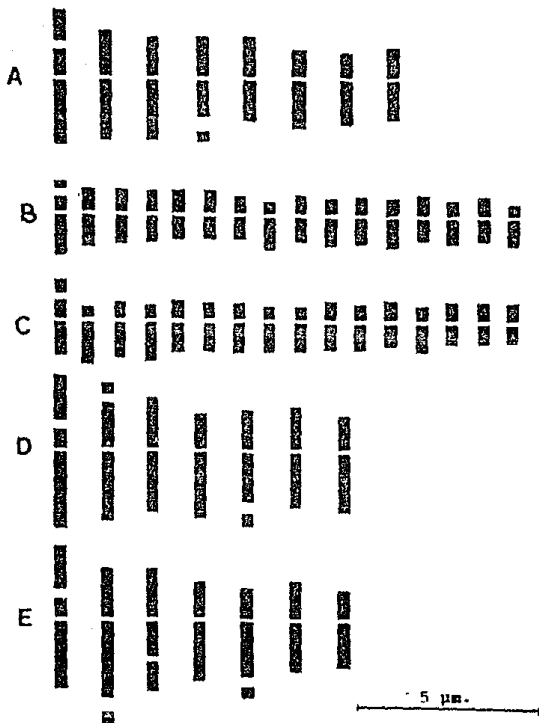


FIGURA 7. Idiogramas de cuatro especies de *Crotalaria*. (A) *C. spectabilis*, $2n=16$, $10m + 6sm$; (B) *C. longirostrata*, $2n=32$, $20m + 10sm + 2st$; (C) *C. pumila*, $2n=32$, $16m + 12sm + 4st$; (D - E) *C. incana*, $2n=14$, $8m + 6sm$; (D) Pobs. de Veracruz, Hidalgo y Tabasco; (E) Pob. de Chihuahua. Los números indican los cromosomas con dobles constricciones.

TABLA III. ANALISIS MEIOTICO EN METAFASE I DE Crotalaria incana, $2n=14$ y $n=7$.

POBLACION	CELULAS ANALIZADAS	BIVALENTES TIPO ANILLO				BIVALENTES TIPO CADENA				QUIASMAS/NUCLEO			I. R.
		NUM.	\bar{x}	+-	S	RANGO	NUM.	\bar{x}	+-	S	RANGO	\bar{x}	
TABASCO	40	130	3.22	1.08	1-5	150	3.78	1.08	2-6	10.22	1.08	17.22	
HIDALGO	51	149	2.92	1.29	1-6	208	4.08	1.29	1-6	9.92	1.29	16.92	
VERACRUZ	40	112	2.68	0.97	0-4	168	4.32	0.97	3-7	9.68	0.97	16.68	
CHIHUAHUA	28	72	2.52	1.23	1-5	125	4.48	1.23	2-6	9.52	1.23	16.52	

NOTAS: \bar{x} = PROMEDIO

S = DESVIACION ESTANDAR

I. R. = INDICE DE RECOMBINACION

TABLA IV. ANALISIS MEIOTICO EN ANAFASE I Y VIABILIDAD DEL POLEN DE Crotalaria incana, n=7.

POBLACION	CELULAS ANALIZADAS EN A I.	A N A F A S E I				VIABILIDAD DEL POLEN			
		NORMAL		ANORMAL		POLEN ANALIZADO	POLEN VIABLE	% DE VIABILIDAD	
		TOTAL	%	TOTAL	%			\bar{x}	$\pm S$
TABASCO	452	439	97.12	13	2.88	-----	-----	-----	-----
HIDALGO	278	274	98.56	4	1.44	2,537	2,438	96.10	0.83
VERACRUZ	146	145	99.31	1	0.69	7,740	7,484	96.69	0.94
CHIHUAHUA	123	120	97.56	3	2.44	3,555	3,171	89.20	1.56

DISCUSION

El número somático $2n=16$, obtenido de *Crotalaria spectabilis* concuerda con lo informado por Atchison (1951); Datta y Mondal (1969), Boulter et al. (1970); Verma et al. (1984) y Bairnigajan y Patnaik (1989), así mismo es congruente con lo informado por Verma y Raina (1983), quienes analizan la metafase I de microsporogénesis de esta especie, obteniendo el número gamético $n=8$.

El número somático $2n=32$ de *C. longirostrata* es el primer informe de esta especie, el cual concuerda con el número gamético $n=16$ informado por Verma y Raina (1983), quienes analizan la metafase I de microsporogénesis de *C. longirostrata*.

Por su parte, el número somático $2n=32$ de *C. pumila* ha sido informado previamente por Fernández (1977) al analizar poblaciones distribuidas en Argentina, así mismo es congruente con el número gamético $n=16$ obtenido en el presente estudio, el cual igualmente ha sido informado por Ward (1983) al estudiar poblaciones de *C. pumila* de Estados Unidos de América.

Crotalaria incana puede considerarse dentro del grupo de especies más estudiadas citológicamente en el género *Crotalaria*, existiendo informes de números somáticos con $2n=14$ de manera consistente por varios autores (Magdon et al. 1963; Chennaveeraiah y Patil, 1970; Fernández, 1977; Gupta y Gupta, 1978a; Raina y Verma, 1979) al estudiar

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

poblaciones de América del Sur, Asia y África. El número $2n=14$ se confirma en este trabajo al analizar 4 poblaciones de *C. incana*, correspondientes a los Estados de Veracruz, Hidalgo, Tabasco y Chihuahua. Así mismo, al analizar la metafase I y anafase I de microsporogénesis de las poblaciones antes señaladas, en las que se obtuvo el número gamético $n=7$, el cual concuerda con lo informado previamente (Chennaveeraiah y Patil, 1970; Magoon et al. 1963 y Verma y Raina, 1983).

Los números cromosómicos $2n=16$ de *Crotalaria spectabilis*, $2n=32$ de *C. longirostrata* y *C. pumila* y $2n=14$ ($n=7$) de *C. incana*, obtenidos en el presente estudio son evidencia de toda la variación cromosómica publicada sobre el género *Crotalaria*, variación que conforma la serie poliploide constituida por los números $n=8, 16, 7$ y 21 , observados en más de 195 taxa (Frahm-Lehfeldt, 1950; Meege, 1962; Magoon et al. 1963; Chennaveeraiah y Patil, 1970, 1972, 1973; Windler, 1971, 1973, 1974; Bhaumik, 1975; Fernández, 1977; Gupta y Gupta, 1978a, 1978b; Raina y Verma, 1979; Verma et al. 1982, 1984; Verma y Raina, 1983; Ward, 1983; Husaini y Gill, 1985; Bairigajan y Patnaik, 1989). A partir del análisis de los números cromosómicos presentados por las especies de *Crotalaria* ha sido posible plantear el número básico (x) de este género:

Originalmente Wanscher (1934) propone el número básico $x=4$, basándose en suponer de la existencia de taxa

primitivos que presentaban dicho número y los cuales en el curso de la evolución se extinguieron, siendo sin embargo los ancestros de los taxa actuales. Esta primera hipótesis sobre el número básico ha tenido poco apoyo en evidencias concretas, particularmente con el mayor estudio del género, de manera que no se ha informado de alguna especie que presente el $x=4$, no solo en *Crotalaria*, sino en todas las leguminosas. Por otra parte, de los análisis meióticos llevados a cabo en el género, puede considerarse la formación de multivalentes un evento más bien raro o poco frecuente (Datta y Bhowas, 1962; Maggon et al., 1963; Verma y Raina, 1983), así mismo ninguna de las especies poliploides presenta los números $2n=28, 36$ ó 40 , etc., como sería lo esperado si $x=4$ fuera el número básico del género (Chennaveeraiah y Patil, 1970).

Otro de los planteamientos sobre el número básico, fue el de Bhaumik (1975), quien considera un $x=7$ para el género. Bhaumik (1975) basa su proposición en considerar que existen especies en el género *Crotalaria* que presentan los números cromosómicos $n=7$ y $2n=14$, informados de manera consistente por varios autores y particularmente a partir del estudio de *C. ferruginea*, en la cual observa un $n=21$, número caracterizado por la formación de heptavalentes en metafase I de meiosis, lo cual es atribuido a que es una especie hexaploide originada a partir del $x=7$. Así mismo, sobre el $n=8$ ($2n=16$) tan ampliamente difundido en el género, Bhaumik (1975) considera que pudo haberse originado por una

duplicación de un cromosoma, generando el número $n=8$, de manera que, el estar tan bien representado este número en el género puede deberse a que representa alguna ventaja adaptativa para las especies que los presentan.

Sin embargo no es del todo evidente lo planteado por Bhaumik (1975), en lo referente a los multivalentes observados en metafase I de *C. ferruginea*, los cuales son atribuidos por algunos autores a alteraciones estructurales, más que a poliploidías (Chennaveeraiah y Patil, 1970, 1972; Raina y Verma, 1979; Husaini y Gill, 1985). Así mismo tales evidencias solo son reflejo de lo ocurrido en una sola especie, la cual representa un pequeño porcentaje (0.51%) en relación a las especies analizadas citológicamente dentro del género.

Finalmente el número básico $x=8$, propuesto primordialmente por Seno (1959) y Atchison (1961) y aceptado de manera generalizada por otros investigadores (Datta y Ganguly, 1967; Chennaveeraiah y Patil, 1972; Gupta y Gupta, 1976; Husaini y Gill, 1985, etc.), se basa en el gran número de especies que han sido analizadas citológicamente dentro del género, observándose en la mayoría de ellas (86.67%) los números gamético, $n=8$ o el somático, $2n=16$, así mismo estos números se han encontrado en taxa que no sólo son diferentes morfológicamente, sino que además están presentes de manera amplia en los trópicos y subtropicos. Así mismo prácticamente todos los poliploides reconocidos y que son

observados de manera constante en diferentes poblaciones y especies, presentan el $x=8$.

A partir de lo anteriormente planteado puede considerarse que el número básico primitivo o número tipo del género *Crotalaria* es el $x=8$, a partir del cual se origina el número $x=7$, ya sea por aneuploidia (Patil y Chennaveeraiah, 1975) o por rearrreglos estructurales que propician la pérdida de un par de centrómeros (Atchison, 1951; Gupta y Gupta, 1978a). En este sentido puede considerarse que lo bien establecido de los números $x=8$ y $x=7$ permite considerar a *Crotalaria*, un género dibásico.

Al analizar la longitud total de cromatina (LTC) de las cuatro especies, los valores más altos correspondieron a *C.spectabilis* con 21.49 μm y a *C.incana* con 21.81 μm , menor LTC se observó en *C.pumila* con 20.64 μm y en *C.longirostrata* con 20.44 μm , sin embargo las LTC de las cuatro especies no manifestaron notables diferencias como las que se observaron en el tamaño de los cromosomas de *C.spectabilis* y *C.incana* al presentar cromosomas grandes respecto de *C.pumila* y *C.longirostrata* cuyos cromosomas fueron muy pequeños (TABLA I).

Al comparar la LTC de *C.spectabilis* (21.49 μm) y *C.incana* (21.81 μm), con lo informado en la literatura, se observan algunas diferencias. Para *C.spectabilis* se informa un valor de 26.48 μm (Verma et al. 1984) y para *C.incana* se informan valores muy variables que comprenden de 20.6 (Gupta y Gupta,

1978a), 24.1 (Raina y Verma, 1979), 26.6 (Magoon et al. 1963) 28.08, 30.65 hasta 38.64 μm (Patil y Chennaveeralah, 1975), en este sentido, los valores obtenidos en el presente trabajo podrían considerarse en algunos casos muy contrastantes con los informados en la literatura, sin embargo todos los valores de cromatina total obtenidos para ambas especies correspondieron al valor más alto o de los más altos, como se observa en el presente trabajo para *C. spectabilis* y *C. incana*, de manera que pueden considerarse congruentes con lo informado. En este sentido las diferencias observadas en la LTC de *C. spectabilis* y *C. incana* en relación a lo informado en la literatura puede deberse al efecto de las condiciones geográficas en las que se encuentra, mismas que pueden haber propiciado la modificación de los valores totales de cromatina para la misma especie, lo cual puede considerarse un mecanismo de adaptación de estas especies (Rothfels y Siminovitch, 1958; Swanson, 1958), este proceso ha sido señalado en algunas especies del género *Gibasis*, en el cual se ha observado una relación entre las variaciones del contenido de ADN nuclear, el fenotipo y la latitud, sugiriendo que los cambios cualitativos de ADN cromosómico pueden tener efecto adaptativo en las especies de este género (Kenton, 1983). Sin embargo, tales diferencias en la LTC deben ser ponderadas ya que a diferencia de la medición del contenido de ADN nuclear, la medición de la longitud total de cromatina es un método menos preciso, en este sentido Patil

y Chennaveerajah (1975) y Gupta y Gupta (1978a) señalan que en algunos casos las diferencias en la LTC para la misma especie, pueden ser efecto de la técnica citológica empleada, por lo que dichos valores no son comparables estrictamente, pero si permiten conocer de manera proporcional la variación entre las taxa, en este sentido una estimación adecuada puede ser obtenida manteniendo el material a condiciones controladas y uniformes (Lightly y Plansted, 1960).

Al considerar la LTC de *C. incana*, parece evidente que la disminución del número cromosómico no ha involucrado una pérdida de material genético, dado que presenta una LTC de las más altas lo que es congruente con lo informado por Gupta y Gupta (1976) quienes analizaron el contenido de ADN nuclear de 13 especies de *Crotalaria*, obteniendo el valor más alto en *C. incana*. Más bien la reducción en el número cromosómico podría suponer la existencia de rearrreglos estructurales que originaron la reducción en el número cromosómico, con el consiguiente aumento en la longitud de los cromosomas, por lo cual se observan los cromosomas más grandes de las especies analizadas, siendo más grandes inclusive a los observados en *C. spectabilis*. Estas observaciones son congruentes con lo señalado por Gupta y Gupta (1978a) al considerar el origen de la subsección *Incanae* a partir de la sección *Grandiflorae*, manifestándose esto por un aumento en la longitud de los cromosomas pequeños en relación los grandes y con una evidente

disminución del número cromosómico de $2n=16$ a $2n=14$. Entre la sección Grandiflora y la subsección Incanae existen similitudes en la morfología externa, proteínas (globulinas) y presencia de cromosomas de gran longitud (Boulter et al. 1970).

Por otra parte Maqoob et al. (1963) consideran que la presencia de cromosomas significativamente grandes en *C. incana*, pueden representar un alto grado de especialización, apoyado esto por la presencia de características morfológicas y fenológicas distintivas de esta especie, tales como la reducción en su desarrollo vegetativo, un alto grado de pubescencia, reducción en el número de flores en las inflorescencias y una tendencia general hacia la disminución en la duración de su ciclo de vida, características que son consideradas como filogenéticamente más avanzadas dentro del género.

La estructura cariotípica de las cuatro especies reflejó características comunes, siendo particularmente notable la simetría observada en todas ellas, sin embargo fue posible establecer diferencias particulares en cada especie, tales como el número cromosómico, la longitud cromosómica, la fórmula cariotípica, así como la posición y el número de dobles constricciones, todos ellos, aspectos importantes para establecer diferencias interespecíficas.

Al analizar el cariotipo de *C. spectabilis*, constituido por $10m+6sm$, se observaron diferencias importantes con los

informados para poblaciones con distribución en Asia, las cuales presentaron $14m+2sm$ (Bairdagan y Patnail, 1989) y particularmente el constituido por $4m+10sm+2st$ (Verma et al. 1984), sin embargo las dos poblaciones analizadas en el presente trabajo, correspondientes al Estado de Veracruz, fueron muy constantes cariotípicamente, no observándose diferencias como las que se manifiestan en las poblaciones asiáticas.

Se informan por vez primera los cariotipos correspondientes a *C. longirostrata* con $20m+10sm+2st$ y a *C. pusilla* con $16m+12sm+4st$. Los cromosomas de ambas especies fueron uniformes en tamaño y forma, lo que se reflejó en cariotipos muy simétricos, particularmente el de *C. longirostrata* la cual presentó el índice de asimetría más alto (TABLA III). Así mismo la semejanza entre ambos cariotipos en cuanto a forma, tamaño y presencia de manera característica de un par de satélites es congruente con lo señalado por Windler y McLaughlin (1980) al considerar a ambas especies relacionadas filogenéticamente.

El análisis citológico llevado a cabo en las cuatro poblaciones de *C. incana* permitió determinar el cariotipo constituido por $8m+6sm$, el cual contrasta con lo informado por Patil y Chennaveeraish (1975) quienes indican poblaciones con distribución en la India y África, cuyos cariotipos constituidos por $14m$ presentaron gran variación en el número y posición de las dobles constricciones,

aspecto que señalan como una consecuencia de rearrreglos estructurales particularmente translocaciones involucradas en el complemento cromosómico de *C. incana*, los cuales son asociados con procesos de especiación al producir diferentes citotipos y especialización morfológica. Las variaciones observadas en el presente estudio entre las poblaciones de *C. incana* en relación al número y posición de las dobles constricciones, fueron las siguientes: de manera característica se presentaron 2 pares de metacéntricos y 1 par de submetacéntricos con satélites, en las poblaciones de Veracruz, Hidalgo y Tabasco. Sin embargo, de manera adicional en la población de Chihuahua se observó un par de cromosomas metacéntricos con una constricción secundaria. La presencia de satélites y constricciones secundarias en el mismo complemento cromosómico ha sido informada por Patil y Chennaveeraiah (1975) para *C. incana*, señalando la presencia de manera generalizada en el complemento únicamente de satélites en la mayoría de las poblaciones muestreadas y sólo en algunas poblaciones observaron satélites y constricciones secundarias. De lo anterior puede considerarse que la aparición de rearrreglos estructurales puede estar generando cambios en el número y posición de los satélites en el complemento de *C. incana*, tal como lo señala Patil y Chennaveeraiah (1975) a la vez que pueden haber originado un cariotipo diferente del señalado para las especies asiáticas, pudiendo ser este evento camino de especiación como ha sido señalado previamente.

Las diferencias observadas en el cariotipo de las poblaciones de *Crotalaria incana* igualmente se reflejaron en el comportamiento meiótico de metafase I y la viabilidad del polen de esta especie. En el análisis meiótico llevado a cabo en metafase I, se observaron diferencias congruentes con lo señalado en el análisis cariotípico de *C. incana*, particularmente en relación al promedio de quiasmas por núcleo y el índice de recombinación, parámetros que son importantes para medir el número promedio de bloques de genes segregantes en la división, lo cual permite conocer la variabilidad genética de la población y de esta forma, es posible hacer una aproximación sobre la respuesta que tendría ésta ante un ambiente específico (White, 1973; Sáez y Cardoso, 1978). En este sentido los índices de recombinación de las poblaciones de Veracruz, Hidalgo y Tabasco al ser más altos en relación al presentado por la población de Chihuahua (TABLA IV), representan un mayor número de nuevas combinaciones en la progenie y una población más adaptable ante cambios ambientales, producto de su mayor variabilidad genética, originada posiblemente por estar expuestas a ambientes más fluctuantes. Este aspecto explica los promedios de viabilidad más altos de las poblaciones de Hidalgo y Veracruz (TABLA IV) con respecto al de la población de Chihuahua, la cual, como se señaló previamente, presentó el índice de recombinación menor y por lo tanto, puede considerarse que esta población presenta la menor variabilidad genética de la muestra analizada de *C. incana*.

de manera que se ve afectada de manera más notoria por variaciones ambientales, tal como lo refleja su promedio de viabilidad del polen (TABLA IV).

Aún cuando el comportamiento meiótico de metafase I y anafase I fue normal en la muestra analizada de *C. incana* en términos generales, como se observa en las TABLAS III y IV, también se observaron algunas células con irregularidades meióticas, particularmente en anafase I, en esta fase, se presentaron puentes simples sin fragmento acéntrico, estas estructuras han sido observadas previamente al tratar con radiación ionizante células madres del polen del género *Trillium* (Wilson et al. 1959 cit. por Brandham, 1970), sin embargo Lewis y John (1966) señalan que la ocurrencia de este tipo de estructuras se manifiesta de manera espontánea en gran número de plantas y animales y su ocurrencia es particularmente amplia en algunas especies de gorriones, chapulines. De manera espontánea se han observado en el género *Podophyllum* por Neuman (1967) y en la tribu Aloineae por Darlington y Lafallion (1957), Vig (1968) y Brandham (1970). Por su parte en el género *Crotalaria* se ha informado de la presencia de puentes dicéntricos con fragmentos acéntricos en *C. incana* (Magoon et al. 1963) y en *C. sericea*, siendo asociadas dichas estructuras a inversiones paracéntricas (Verna et al. 1982), sin embargo los puentes simples sin fragmentos acéntricos, observados en el presente estudio son la primera información al respecto en el *Crotalaria*.

Este tipo de irregularidad meiótica ha sido estudiada ampliamente por Brandham (1970) observándola de manera espontánea en gran número de especies de la tribu Aloineae, en la cual se presentan con una frecuencia del 1 al 10% de manera general, aún cuando en *Gasteria armostrongii* y *Aloe aristata* alcanzan hasta un 27 y 29% respectivamente, casi invariablemente el puente formado involucra el brazo largo del cromosoma más largo, aún cuando también se observan puentes constituidos por los brazos largos de los cromosomas cortos, en todos los casos, los puentes se caracterizan por unir dos cromátidas homólogas, presentando en la parte media del puente un par de pequeños brazos que pueden variar en su tamaño o bien no aparecer, pero especialmente por la gran extensión y ausencia de un fragmento acéntrico, por lo que este tipo de puentes es denominado Subcromatídico (Brandham, 1970).

Se han reconocido dos tipos de puentes subcromatídicos: el tipo X, caracterizado porque los pequeños brazos de la parte media del puente, tienden a ser divergentes a partir del punto que los une y el tipo U, en el cual los pequeños brazos son paralelos y se insertan ligeramente aparte uno del otro (Brandham, 1970). Sin embargo, en el presente estudio no fue posible determinar el tipo de puente subcromatídico, debido a que la muestra analizada no permitió observar con claridad las estructuras antes señaladas.

El origen de dichas irregularidades meióticas puede deberse a malfuncionamientos en los sitios de formación de los quiasmas, tal como lo determina Brandham (1970), al correlacionar ambos eventos en *41ae aristata*, de manera que el rompimiento de cuatro subcromátidas en el sitio de formación de un quiasma origina diferentes patrones de reunión. En este sentido Brandham (1970) señala que el origen de los puentes subcromatídicos, puede no estar afectado por algún tipo de método de cultivo, puesto que en algunas ocasiones, el análisis meiótico llevado a cabo el mismo día en dos plantas desarrollándose en el mismo lugar, muestra grandes diferencias entre ambas, al contar con gran número de puentes subcromatídicos una planta y la otra ninguno. En este sentido es posible que ante cambios ambientales un individuo sea capaz de influir sobre la frecuencia de dichas irregularidades meióticas y el otro no (Brandham, 1970).

Por otra parte, las células poliploides, observadas en el tejido somático de *C. pumila* con una frecuencia de 3.7% y en *C. incana* con 4.9%, se caracterizaron por ser complementos cromosómicos duplicados (en número y forma) respecto del complemento normal de ambas especies, estas células poliploides pudieron haberse originado por endomitosis, al ocurrir la replicación de los cromosomas, pero sin efectuarse la división del núcleo, por lo cual se observan dos complementos cromosómicos con idéntico número y forma.

Estos errores en la mitosis se han observado en tejido de plantas y animales, particularmente en células epidérmicas de algunas especies de las familias Gramineae y Anacaeae (Stebbins, 1971). Sin embargo, el efecto de estos errores en la mitosis carece de importancia para las generaciones siguientes, al no originarse directamente de las células edopoliploides nuevos organismos, no obstante para la planta se sugiere que dichas células pueden favorecer su desarrollo, al sintetizar una mayor cantidad de proteínas en un periodo de tiempo más corto (Stebbins, 1971).

Sin embargo, la poliploidía como proceso de especiación en el género *Crotalaria*, es considerada por Husain y Gill (1985) muy baja, del orden del 1.27%, no obstante una revisión más reciente (ver Citología del género *Crotalaria*) indica que el número de especies poliploides informadas, comprenden más del 10% del total analizado citológicamente, lo cual hace suponer que este proceso es más importante de lo señalado previamente.

Dentro del grupo de especies poliploides el nivel más alto, corresponde al hexaploide con $6n=42$, informado únicamente en *C. terraquea* (Ehizumi, 1975), de manera que en la mayoría de las especies poliploides reconocidas actualmente, se presenta el nivel tetraploide con $2n=4x=32$, observado en *C. foliosa*, *C. gorgochensis*, *C. humifusa*, *C. karikalensis*, *C. medicaginea*, *C. sayaritenensis*, *C. sitens*, *C. paulina*, *C. pilosa*, *C. prostrata*, *C. quercetorum*, *C. rhodesiae*, *C. rotundifolia* var. *linaria*, *C. sagittalis*,

C.stipularia, *C.sericea* y *C.velutina*. De estas especies se ha llevado a cabo el análisis cariotípico de *C.insens*, (Chennaveeraiah y Patil, 1973), *C.paulina*, *C.sagittalis* y *C.stipularia* (Verma et al. 1984). Los cariotipos de estas especies forman grupos de 2 y 4 cromosomas, implicando con esto que dichas especies no son autotetraploides. Así mismo, debido a la poca diferenciación cromosómica de la mayoría de las especies diplóides es evidente que no se pueden formar grupos idénticos de cromosomas en los cariotipos, si las especies con $2n=32$, tienen un origen alloploide (Chennaveeraiah y Patil, 1973). Los análisis meióticos apoyan esta idea, ya que todas las especies consideradas poliploides (con $2n=32$) de manera general presentan asociaciones cromosómicas con 16 bivalentes en metafase I, siendo los multivalentes poco comunes (Verma y Rainy, 1983).

Adicionalmente de estudios taxonómicos se han obtenido evidencias que apoyan las consideraciones anteriores. En este sentido se señala al Este de África y la India como los dos primeros y más importantes centros de origen y diversificación de *Crotalaria* (por contar con el mayor número y diversidad de especies), así mismo algunas de las especies consideradas primitivas dentro del género, se encuentran en dichas regiones y practicando todas las especies de África y la India presentan los números $2n=16$ y $2n=14$, siendo muy pocas las especies con $2n=32$, en África la única especie que lo presenta es *C.massaiensis* (Chennaveeraiah y Patil, 1973). En este sentido el número

cromosómico $2n=32$ se considera que corresponde a especies del Nuevo Mundo, mismas que tuvieron un origen posterior a las especies con $2n=16$ e igualmente las especies diploides que originaron el número $2n=32$ son del Nuevo Mundo, las cuales pudieron haberse originado por un flujo genético procedente del Este de Asia (Polhill, 1968), esta consideración es apoyada por Windler (1973) al analizar un gran número de especies de la India, las cuales presentaron características morfológicas similares a las americanas, particularmente *C.alata* y *C.prostrata*. De lo anterior puede considerarse que si bien la poliploidía no ha tenido gran importancia dentro del género, particularmente en el Viejo Mundo, en las especies americanas parece que esto no es tan evidente, dado que la mayoría de las especies poliploides se han encontrado en el Nuevo Mundo, las cuales manifiestan características propias respecto de las asiáticas y africanas. En este sentido un muestreo más amplio de las especies con distribución en América como *C.longirostrata* y *C.pumila* resulta importante, particularmente llevar a cabo análisis meióticos para conocer los tipos de organizaciones cromosómicas en metafase I y anafase I, así como determinar los tipos de reproducción, aspecto que es considerado importante en relación al origen de la poliploidía en las especies tetraploides (Windler, 1973).

Así mismo, una característica observada en las especies con $2n=32$ como *C.longirostrata* y *C.pumila*, fue el presentar cromosomas pequeños, en comparación a los observados en las

especies con $2n=16$ y $2n=14$, este aspecto puede atribuirse al aumento en el nivel de ploidía de un nivel diploide a uno tetraploide. Sin embargo, esta reducción en la longitud cromosómica, parece no haber involucrado una reducción en la longitud total de cromatina, ya que en ambas especies esta se mantuvo aproximadamente en el mismo nivel de las especies diploides, tal como se observa en la TABLA II. Dicha tendencia de las especies poliploides, a disminuir la longitud cromosómica ha sido informada por varios autores Downick, 1952; Ved Prat, 1965 y Raina y Khoshoo, 1971, siendo atribuida como una adaptación de los poliploides para mantener el balance núcleo-citoplasma cercano al nivel diploide, tal disminución puede ser el resultado de una reducción en el nivel de poliploidía o bien por la pérdida de información de material duplicado (Darlington, 1963).

Finalmente del análisis llevado a cabo parece evidente que los cambios estructurales han tenido un papel importante en la evolución del género, aún cuando la consideración de Gupta y Gupta (1978a) no ha modificado de manera significativa el cariotipo, por lo que *Crataeva* presenta cariotipos primordialmente simétricos. En este sentido la estabilidad cariotípica y la simetría pueden impedir correlacionar la diferenciación cromosómica con procesos de especiación (Magdon et al. 1963; Chennaveeraiah y Patil, 1973), en este sentido una evidencia de la diferenciación entre especies puede ser obtenida por medio de la estimación

del contenido de ADN nuclear o la longitud cromosómica como se ha realizado en investigaciones previas (Gupta, 1976).

CONCLUSIONES

A partir de la información obtenida en el presente estudio se llegó a las siguientes conclusiones:

1. Los números cromosómicos; $2n=16$ de *Crotalaria spectabilis* Roth., $2n=32$ de *C. longirostrata* Arn. y Hook. y *C. pusilla* Ort. y el $2n=14$ ($n=7$) de *C. incana*, obtenidos en el presente estudio, son evidencia de la variación cromosómica informada sobre *Crotalaria*, estos números cromosómicos permiten considerar un género dibásico constituido por los números $n=8$ y $x=7$.
2. Existen diferencias importantes entre los cariotipos de las cuatro especies estudiadas, lo cual permite establecer tres grupos cariotípicos bien definidos: el primero corresponde a *Crotalaria longirostrata* y *C. pusilla*, con un número somático de $2n=32$, presentando cromosomas pequeños y un sólo par cromosómico con dobles constricciones; el segundo grupo corresponde a *C. incana*, con un número somático de $2n=14$, contando con los cromosomas más grandes y el mayor número de cromosomas con dobles constricciones (con 3 y 4) y el tercero, corresponde a *C. spectabilis*, cuyo cariotipo presentó un $2n=16$, contando con cromosomas de longitud intermedia, respecto de los dos grupos anteriores y dos pares cromosómicos con dobles constricciones.

3. Las diferencias observadas entre las poblaciones de *C. incana* en relación al número y posición de los satélites y construcciones secundarias en el cariotipo, comportamiento meiótico y la viabilidad del polen, son reflejo de cierto grado de diferenciación entre las poblaciones de esta especie, tales diferencias pueden haberse generado como consecuencia de la presencia de rearrregios estructurales implicados en la evolución de *C. incana*, mismos que pudieron haber originado la reducción en el número básico de $x=8$ a $x=7$.

BIBLIOGRAFIA

- Adams, R. y Rogers, E. F. 1922. The structure of Monocrotaline, the alkaloid in *Crotalaria spectabilis* and *Crotalaria retusa*, I. J. Amer. Chem. Soc., 61:2615-2634.
- Arellano, J. 1986. Etnobotánica de Leguminosas: Notas sobre algunas de las especies utilizadas en la alimentación en México. An. Inst. Biol. UNAM, Ser. Botánica, 57:123-142.
- Arseculeratne, S. N., Gunatilaka, A. L. y Panabokke, R. G. 1984. Studies on medicinal plants of Sri Lanka. Part 14: Toxicity of some traditional medicinal herbs. Elsevier Sci. Pub. Ireland Ltd., pp. 323-325.
- Atchison, E. 1951. Studies in the Leguminosae. VI. Chromosome number among tropical woody species. Amer. J. Bot., 38:539-546.
- Bairigajan, G. C. y Patnaik, S. N. 1969. Chromosomal evolution in Fabaceae. Cytologia, 54:51-64.
- Bernal, H. 1986. Flora de Colombia. Ed. Universidad Nacional de Colombia, Colombia, 103 p.
- Bhatt, R. 1974. Studies on the flora in north Gujarat III: Cytology. The Nucleus, 17:33-39.
- Bhatt, R. 1976. In: 1975 Chromosome Number Reports Taxon, 25:37-39.
- Bhaumik, G. H. 1975. Chromosome studies of some Indian species of *Crotalaria*. Sci. and Culture, 41:521-523.
- Bir, S. S. y Kumari, S. 1977. Evolutionary status of Leguminosae from Pachmarhi Central India. The Nucleus, 20:94-97.
- Boulter, D., Derbyshire, E., Frahm-Leliveld, J. A. y Polhill, R. M. 1970. Observations on the Cytology and Seed-Proteins of various African species of *Crotalaria* L. (Leguminosae). New Phytol., 69:117-131.
- Brandham, P. E. 1970. Chromosome behaviour in the Alceinae III. Correlations between spontaneous chromatid and sub-chromatid aberrations. Chromosoma (Berl.), 31:1-17.
- Caballero, J. 1985. Exploración de Recursos Genéticos Potenciales. In: G. Palomino y E. Pimenta (coord.). Memorias del Seminario sobre la Investigación Genética Básica en el Conocimiento y Evaluación de los Recursos

Genéticos. 1995. Jardín Botánico, Instituto de Biología, SOMEFI, México, pp. 28-40.

Chennaveeraiah M. S. y Patil, B. C. 1970. Chromosome numbers in the genus *Crotalaria*. J. Karnatak University. Sci., 17:140-148.

Chennaveeraiah, M. S. y Patil, B. C. 1972. Chromosome numbers in the genus *Crotalaria* and chromosome number in certain other species. Sci. and Cult. 35:154-155.

Chennaveeraiah, M. S. y Patil, B. C. 1973. Chromosome number and karyotype study in eight species of *Crotalaria*. Cytologia, 38:73-79.

Conger, A. D. y Fairchild, L. M. 1953. A quick freeze method for making smear slides permanent. Stain Technol., 28:281-283.

Darlington, C. D. 1958. Evolution of Genetics System. Oliver and Boyd, London.

Darlington, C. D. 1963. Chromosome Botany and the Origins of Cultivated Plants. Ed. G. Allen and Unwin, London, 231 p.

Darlington, C. D., Kefallion, M. 1957. Correlated chromosome aberrations at meiosis in *Gasteria*. Chromosoma (Berl.), 8:364-370.

Datta, R. M. 1955. Chromosome number of *Crotalaria juncea* L. Curr. Sci., 34:34.

Datta, R. M. y Biswas, P. K. 1962. Meiotic studies and chiasma frequencies in some *Crotalaria* species. Portug. Acta Biol., 9: 257.

Datta, R. M. y Choudhury, P. C. 1966. Karyotype in *Crotalaria*. Bull. Torrey Bot. Club, 93:241-243.

Datta, R. M. y Ganquly, P. K. 1967. Karyotypic study in the genus *Crotalaria*. I. Broteria. Serie de Ciencias Naturais, 36:39-46.

Datta, R. M. y Goshal, K. K. 1969. Karyotypic study in genus *Crotalaria* III. Zeitschrift für Pflanzengüchtung, 61:58-62.

Datta, R. M. y Mondal, M. 1969. New cytotypes in a species of *Crotalaria* and chromosome number in certain other species. Sci. and Cult. 35:154-155.

Datta, R. M. y Neogy, A. K. 1965. Meiotic studies and chiasma frequencies in some *Crotalaria* species. II. Philippine Agriculturist, 49:191-196.

Dowrick, G. J. 1952. The chromosomes of *Chrysanthemum* L. Heredity 6:355-375.

Dyer, A. 1979. Investigating Chromosomes. Ed. Edward Arnold, London, 139 p.

Fernández, A. 1977. Numeros cromosómicos en Angiospermas. Hickenia, 1:83-86.

Frahm-Leliveld, J. A. 1960. Chromosome numbers in Leguminous plants. Acta Bot. Neerl., 9:327-329.

García V., A. 1988. Técnicas y Procedimientos de Citogenética Vegetal. Ed. Universidad Autónoma de Chapingo, México, 196 p.

Goldblatt, P. 1981. Cytology and the phylogeny of Leguminosae. In: R. H. Poihill y P. H. Raven (eds.). Advances in Legume Systematics. Academic Press, New York, pp. 427-463.

Gupta, P. K. 1976. Nuclear DNA, nuclear area and nuclear dry mass in thirteen species of *Crotalaria* (Angiospermae, Leguminosae). Chromosoma (Berl.), 54:155-164.

Gupta, R. y Gupta, P. K. 1978a. Karyotypic studies in the genus *Crotalaria* Linn. Cytologia, 43:357-369.

Gupta, R. y Gupta, P. K. 1978b. Pachytene karyotype in the genus *Crotalaria* L. (Leguminosae). Cytologia, 43:655-663.

Hernández, E. 1985. Biología Agrícola. Ed. CENSA, México, 62 p.

Heywood, V. H. (ed.). 1979. Flowering Plants of the World. Ed. Oxford University Press., 375 p.

Husaini, S. W. H. y Gill, L. S.. 1965. Cyto-morphological studies of the genus *Crotalaria* L. (Leguminosae: from Nigeria. Bol. Soc. Brot., Ser. 2, 58:149-172.

Isely, D. 1982. Leguminosae and *Homo sapiens*. Economic Botany, 36:46-70.

John, B. 1976. Populations Cytogenetics. Ed. Edward Arnold, The Camelot Press Ltd., South Ampton, London, 76 p.

Kenton, A. 1981. Quantitative and qualitative chromosome change in the evolution of *Gibasis*. New Chromosome Conference II. George Allen and Unwin, pp. 273-281.

Kenton, A. 1986. Importancia de los cromosomas en la especiación y evolución como base para el conocimiento y caracterización de especies vegetales con valor potencial.

In: G. Palomino H. (ed.). III Seminario Maximino Martínez. 1986. La Aplicación de la Citogenética en el Conocimiento Biológico de los Recursos Vegetales en México. Jardín Botánico, UNAM, México, pp. 1-10.

Kenton, A., Owens, S y Langton, D. 1988. The origin of ring-formation and self-compatibility in *Gibasis pulchella* (Commelinaceae). In: P. E. Brandham (ed.). Kew Chromosome Conference III. Royal Botanical Gardens Kew, London, pp. 75-84.

Lacadena, J. R. 1988. Genética. Ed. AGESA. Madrid, España. 1303 p.

Levan, A., Fredga, K. y Sandberg, A. A. 1964. Nomenclature for centromeric position on chromosomes. Hereditas, 52:201-220.

Lewis, K. R y John, B. 1966. The meiotic consequences of spontaneous chromosome breakage. Chromosoma (Berl.), 18:287-304.

Lightly, R. y Plansted, R. L. 1960. The evaluation of the sources of variation in the preparation of a karyotype of a clone. Cytologia, 25:1-7.

Magoon, M. L., Koppar, M. N., Ramanna, M. S. y Sinha, A. K. 1963. Cyto-morphological studies in the genus *Crotalaria*. La Cellule, 63:375-396.

Martínez, J. V. 1984. Recolección y Caracterización del Germoplasma de "Chipilin" (*Crotalaria* spp.) de la Vertiente del Pacífico de la República de Guatemala. Tesis. Facultad de Agronomía, Universidad de San Carlos de Guatemala, Guatemala 224 p.

Miege, J. 1962. Nombres cromosómicos de plantas d'Afrique occidentale. Rev. Cytol. et Biol. Veg. 21:373-376.

Montes, J. 1978. Estrategia para la conservación de los recursos genéticos. In: T. Cervantes S. (ed.). Recursos Genéticos Disponibles a México. Ed. SONEFI, México, pp. 29-35.

Naranjo, C. A., Poggio, L. y Brandham, P. E. 1986. A new template for direct morphological classification of chromosomes. Darwiniana, 27:39-41.

Newman, L. J. 1967. Meiotic chromosomal aberrations in wild populations of *Podophyllum peltatum*. Chromosoma (Berl.) 22:258-273.

Palomino, G. 1986. La Aplicación de la Citogenética en el conocimiento biológico de los recursos genéticos. In: G.

Palomino H. (coord.). III Seminario Maximino Martínez. 1986. La Aplicación de la Citogenética en el Conocimiento Biológico de los Recursos Vegetales en México. Jardín Botánico, Inst. de Biología, UNAM, pp. 1-10.

Patil, B. C. y Chennaveeraiah, M. S. 1975. Cytological studies in *Crotalaria incana* L. and *C. mucronata* Desv. The Nucleus, 18:141-145.

Polhill, R. M. 1968. Miscellaneous notes on African species of *Crotalaria* L.: II. New Bull., 22:169-338.

Raina, S. N. y Koshoo, T. N. 1971. Cytogenetics of tropical bulbous ornamentals II. Variation in mitotic complement in *Crinum*. The Nucleus 14:25-29.

Raina, S. N. y Verma, R. C. 1979. Cytogenetics of *Crotalaria* I. Mitotic complements in twenty species of *Crotalaria* L. Cytologia, 44:325-375.

Raven, P. 1970. The bases of Angiosperm Phylogeny: Cytology. Ann. Missouri Bot. Garden, 62:724-764.

Rieger, R., Michaelis, A. y Green, M. M. 1982. Diccionario de Genética y Citogenética Clásica y Molecular. Ed. Alhambra, España 532 p.

Rothfels, K. H. y Siminovitch, L. 1958. The chromosome complement of the Rhesus monkey (*Macaca mulatta*) determined in kidney cells cultivated in vitro. Chromosoma, 9:163-165.

Sáez, F. A. y Cardoso, H. 1978. Citogenética Básica y Biología de los Cromosomas. Ed. OEA, Washington D.C., E.U.A., 124 p.

Senn, H. 1939. The North American species of *Crotalaria*. Rhodora, 41: 317-366.

Srivastava, M. G. 1958. Cytotaxonomic position of *Crotalaria brunnei* Bert. ex DC. Cytologia, 23:192-199.

Sybenga, J. 1960. Non-random distribution of chiasmata rye, *Crotalaria* and *Coffea*. Chromosoma (Berl.), 11:441-445.

Stebbins, L. 1971. Chromosomal Evolution in Higher Plants. Ed. Edward Arnold Ltd., London 216 pp.

Swanson, C. P. 1957. Cytology and Cytogenetics. Macmillan and Co. Ltd. London.

Ved Brad, S. 1965. Genetic system in *Allium* I. Chromosome variation. Chromosoma (Berl.), 16:486-499.

- Verma, R. C., Kesavacharyulu, S. N. y Raina, S. N. 1982. Cytogenetics of *Crotalaria*, III. Possible configurations due to paracentric inversions in *C. sericea* Retz. *Cytologia*, 47:499-502.
- Verma, R. C. y Raina, S. N. 1983. Cytogenetics of *Crotalaria* VIII. Male meiosis in 26 species. *Cytologia*, 48:719-723.
- Verma, R. C., Kesavacharyulu, K. y Raina, S. N. 1984. Cytogenetics of *Crotalaria*, IX. Mitotic complements in 19 species. *Cytologia*, 49:157-167.
- Vig, B. K. 1965. Quadripartite nature of chromosome at some meiotic stages of *Aloe vera* L. *Curr. Sci.*, 34:187-188.
- Wanscher, J. H. 1934. The basic chromosome number of the higher plants. *The New Phytol.*, 33:101-126.
- Ward, D. E. 1983. Chromosome counts from New Mexico and southern Colorado. *Phytologia*, 54:302-309.
- White, M. 1973. *Animal Cytology and Evolution*. Ed. Cambridge University, 961 p.
- Whitehouse, H. L. K. 1980. *Los Mecanismos de la Herencia*. Ed. Vicens-Vives, España, 369 p.
- Wilson, G. B., Sparrow, A. H. y Pond, V. 1959. Subchromatid rearrangements in *Trillium erectum* L. Origin and nature of configurations produced by ionising radiation. *Amer. J. Bot.*, 46:309-316.
- Windler, D. R. 1971. New North American unifoliolate *Crotalaria* taxa (Leguminosae). *Phytologia*, 21:257-266.
- Windler, D. R. 1973. Field and garden studies in *Crotalaria sagittalis* and related species. *Phytologia*, 26:289-354.
- Windler, D. R. 1974. A systematic treatment of the native unifoliolate *Crotalaria*s of North America (Leguminosae). *Rhodora*, 76:151-204.
- Windler, D. R. y McLaughlin, L. 1980. Flora de Panama, Parte V. Familia 88, Leguminosae. *Crotalaria*. *Ann. Missouri Bot. Garden*, 67:599-613.