

00361  
13  
2ef



# UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

DIVISION DE ESTUDIOS DE POSGRADO

"ESTUDIOS CITOGENETICOS EN CUATRO  
GENEROS DE LA FAMILIA PODOSTEMACEAE  
EN MEXICO"

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADEMICO DE  
MAESTRO EN CIENCIAS  
(BIOLOGIA)

P R E S E N T A:  
NORMA OROPEZA HERNANDEZ

DIRECTORES DE TESIS: DR. ALEJANDRO NOVELO RETANA  
DRA. GUADALUPE PALOMINO HASBACH

MEXICO, D.F.

1999

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

27 A660



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

# CONTENIDO

AGRADECIMIENTOS

RESUMEN

INTRODUCCIÓN

ANTECEDENTES

I. Generalidades de la familia Podostemaceae

Descripción

Historia taxonómica

Hábitat y ecología

Importancia

Endemismo

Géneros presentes en México

II. Citogenética

Cromosomas mitóticos

Cariotipo e idiograma

Poliploidía

Evolución del cariotipo

Citotipos

*Cromosomas meióticos*

Estudios del contenido de ADN nuclear

III. Estudios citogenéticos en la familia Podostemaceae

Números cromosómicos

Morfología cromosómica

2

5

5

5

5

7

8

8

9

12

13

13

15

16

18

18

19

22

22

24

IV. Germinación <i>in vitro</i> en la familia Podostemaceae	24
Estudios en semillas de Podostemáceas	26
<b>OBJETIVOS</b>	27
I. Objetivo general	27
II. Objetivos particulares	27
<b>MATERIALES Y MÉTODOS</b>	28
I. Trabajo de campo	28
II. Trabajo de laboratorio	30
Germinación de semillas	30
Pretratamiento	31
Cromosomas mitóticos	31
Elaboración de cariotipos	32
Comosomas meióticos	33
Germinación <i>in vitro</i> para la medición de ADN	33
Determinación del tamaño del genoma nuclear por citometría de flujo	36
<b>RESULTADOS</b>	38
<b>DISCUSIÓN</b>	56
<b>CONCLUSIONES</b>	68
<b>LITERATURA CITADA</b>	70
<b>APÉNDICE</b>	78

## LISTA DE TABLAS

Tabla	Descripción	Pág.
1.	Características diagnósticas de los géneros mexicanos de la familia Podostemaceae.	11
2.	Números cromosómicos reportados en la familia Podostemaceae.	23
3.	Algunas de las características de las semillas de las podostemáceas que crecen en México.	26
4.	Datos de colecta de las 16 poblaciones de seis especies de Podostemaceae examinados en este estudio.	29
5.	Composición del medio de cultivo Murashige & Skoog (1962).	35
6.	Datos de colecta de las tres poblaciones de tres especies utilizadas en la determinación del contenido de ADN utilizando la técnica de citometría de flujo.	37
7.	Números cromosómicos de tres especies mexicanas de la familia Podostemaceae.	45
8.	Valores promedio de las características de los cromosomas de <i>Oserya coulteriana</i> de la población de Jalisco.	45
9.	Valores promedio de las características de los cromosomas de <i>Vanroyenella plumosa</i> la población de Oaxaca.	46
10.	Valores promedio de las características de los cromosomas de <i>Tristicha trifaria</i> de la población de Tabasco.	47
11.	Cariotipo de tres especies de la familia Podostemaceae.	50
12.	Datos del tamaño del genoma nuclear por CF de tres especies de Podostemáceas.	51
13.	Contenido de ADN nuclear (pg) de <i>Oserya</i> sp. nov., utilizando <i>Zea mays</i> como planta de referencia.	51
14.	Comparación de los cariotipos de podostemáceas Asiáticas y Americanas	62

## LISTA DE FIGURAS

Figura	Descripción	Pág.
1.	Localización de las poblaciones de podostemáceas utilizadas en este estudio.	30
2.	Cromosomas mitóticos de <i>Oserya coulteriana</i> de la población de Jalisco.	42
3.	Cromosomas mitóticos de <i>Vanroyenella plumosa</i> de la población de Oaxaca.	43
4.	Cromosomas mitóticos de <i>Tristicha trifaria</i> de la población de Tabasco.	44
5.	Longitud total de la cromatina (LTC) de tres especies de podostemáceas mexicanas.	48
6.	Idiogramas. <i>Oserya coulteriana</i> de la población de Jalisco. <i>Vanroyenella plumosa</i> de la población de Oaxaca. <i>Tristicha trifaria</i> de la población de Tabasco.	49
7.	Contenido de ADN nuclear de <i>Marathrum rubrum</i> (Jalisco), utilizando la técnica de citometría de flujo (CF).	52
8.	Contenido de ADN nuclear de <i>Oserya coulteriana</i> (Jalisco), utilizando la técnica de citometría de flujo (CF).	53
9.	Contenido de ADN nuclear de <i>Oserya</i> sp. nov. (Tamaulipas), utilizando la técnica de citometría de flujo (CF).	54
10.	Contenido de ADN nuclear de <i>Oserya</i> sp. nov. (Tamaulipas), utilizando la técnica de citometría de flujo (CF).	55
11.	Tendencias evolutivas de los números cromosómicos en las dos subfamilias de las Podostemaceae.	66
12.	Relaciones filogenéticas de las Podostemaceae utilizando secuencias de <i>rbcL</i> .	67

## AGRADECIMIENTOS

Quiero expresar mi más sincero agradecimiento a:

Mi director de tesis el Dr. Alejandro Novelo, quien ha sido un guía y un ejemplo a seguir en el área de la investigación, gracias a su apoyo y asesoría constante durante las largas jornadas en el campo, así como por mostrar interés en mi desempeño académico. A la Dra. Guadalupe Palomino por aceptar la codirección de esta tesis, por la asesoría y su trabajo en el laboratorio de Citogenética del Jardín Botánico Exterior (IBUNAM), al realizar la técnica de citometría de flujo, así como por sus valiosas sugerencias.

A mis sinodales: Dra. Judith Márquez Guzmán, M. en C. Jaime Bonilla Barbosa, M. en C. Guillermina Murguía, M. en C. Javier Martínez y al M. en C. Pedro Mercado Ruaro, a quienes agradezco de manera muy especial sus acertadas observaciones al escrito final.

Esta tesis se llevó a cabo gracias a las facilidades proporcionadas por el Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT) y el financiamiento otorgado al Proyecto de investigación denominado “Estudios embriológicos y cariológicos de las Podostemaceae (plantas acuáticas) mexicanas”. A cargo de la Dra. Guadalupe Judith Márquez Guzmán y el Dr. Alejandro Novelo Retana.

Esta tesis se realizó en el laboratorio de Fanerogamia del Instituto de Biología a cargo del M. en C. Pedro Mercado Ruaro, en el laboratorio de Cultivo de Tejidos del Jardín Botánico exterior de la UNAM con la asesoría de la Biól. Ingrid Brunner y del Dr. Abraham Rubluo Islas, así como en el laboratorio de Citogenética del Jardín Botánico Exterior (IBUNAM) a cargo de la Dra. Guadalupe Palomino. Gracias.

Al grupo de colecta: Dr. Alejandro Novelo, Biól. Leandro Ramos, M. en C. Guillermina Murguía, Biól. Adriana García, Dr. Rolf Rutishauser, por compartir conmigo sus conocimientos de botánica y sobre todo por su enorme apoyo en la realización de este trabajo.

Al Biól. Leandro Ramos por su apoyo en computo y elaboración del mapa, y en forma muy especial por su gran compañerismo, así como por permitir la libre expresión de mis ideas, por su apoyo moral, muchas gracias!. De la misma manera agradezco al M. en C. Javier Martínez por su asesoría, por tomar fotografías de los cromosomas de Podostemáceas y sus acertados consejos. Así como al Biól. Alfredo Wong y al Ing. Isaias Miguel por la asesoría en computo y por su amistad. A la Biól. Miriam Laad, quien trabaja con la Dra. Palomino en la técnica de citometría de flujo.

A los compañeros del Laboratorio de Fanerogamia; M. en C. Pedro Mercado, al Maestro Javier Valdés quien siempre estuvo dispuesto a compartir con sus conocimientos de cultura general, al Dr. Fernando Chiang, M. en C. Alfredo Pérez, Yolanda, Catalina, Laura, Jose Ledis, a quienes tuve la fortuna de conocer, gracias por los gratos momentos.

A mis hermanas y amigas Paty y Mary Paz, con quienes tuve la enorme fortuna de compartir todos mis años de estudio en la UNAM y por su apoyo incondicional en todo momento.

## RESUMEN

Los conteos cromosómicos en la familia Podostemaceae representan hasta el momento un 18.4% de los géneros y un 4.8% de las especies. Para contribuir al entendimiento de las relaciones filogenéticas de este grupo de plantas, se obtuvo el número cromosómico ( $2n$ ) y se analizaron los cariotipos en los géneros *Oserya*, *Podostemum*, *Tristicha* y *Vanroyenella*. Se realizaron colectas sistemáticas en localidades de diferentes estados de la República Mexicana con el propósito de obtener material vegetal. Para la obtención de tejido meristemático activo se probaron dos técnicas; la germinación de semillas en acuario y germinación de semillas por cultivo de tejidos *in vitro*.

Se obtuvo por primera vez el número cromosómico de los géneros *Oserya*, *Vanroyenella*, ambos con  $2n = 28$  y para *Tristicha* con  $2n = 20$ .

El análisis cariotípico de *Oserya* y *Vanroyenella* mostró diferencias significativas con respecto a *Tristicha*. Las fórmulas cariotípicas de *Oserya* y *Vanroyenella* consisten de 13 pares de cromosomas metacéntricos y 1 par de submetacéntricos, mientras que el género *Tristicha* presentó 10 pares de cromosomas metacéntricos. El análisis también mostró pequeñas diferencias en el índice de asimetría, el género *Tristicha* presenta el cariotipo más simétrico con un índice de simetría TF% de 48.91 y el más asimétrico lo presenta *Oserya* con un índice de simetría TF% de 45.81.

Los resultados cromosómicos obtenidos en 2 géneros de la familia Podostemaceae, *Oserya* y *Vanroyenella* apoyan una mayor relación taxonómica entre ellos, debido a que presentan números cromosómicos del mismo orden de magnitud  $2n = 28$ , en comparación con el género *Tristicha* cuyo número cromosómico es  $2n = 20$ .

También se realizaron estudios del contenido de ADN en 2 géneros de podostemáceas por citometría de flujo, resultando genomas pequeños de 1.01 pg en *Marathrum rubrum* y 2.33 pg en *Oserya* sp nov.

La subfamilia Tristichoideae presenta un número básico de  $x = 10$ , el análisis de los números cromosómicos de sus miembros indican a la poliploidía como el principal mecanismo de evolución cromosómica. Mientras que la subfamilia Podostemoideae es probablemente un grupo paleopoliploide, presenta los números básicos  $x = 13, 14, 15$  y  $17$  (serie disploide), estas variaciones en los números básicos, de acuerdo al análisis cariotípico se originaron principalmente por aneuploidías debidas a translocaciones.

De acuerdo a las características morfológicas, estudios biogeográficos, análisis filogenéticos utilizando secuencias de *rbcL* y los datos citológicos obtenidos en este trabajo, se apoya la idea de segregación de las subfamilia Podostemoideae y Tristichoideae en nivel de familias.



## INTRODUCCIÓN

La familia Podostemaceae consta de 49 géneros y 250 especies. Aproximadamente un 60% de estas especies se presentan en el Nuevo Mundo, mientras que en el Viejo Mundo habitan un mayor número de géneros (Philbrick & Novelo, 1994). De los 19 géneros y 161 especies presentes en el continente americano, cerca del 70% de las especies se ubican en 4 géneros: *Apinagia* con aproximadamente 50 especies, *Marathrum* con 25 especies, *Rhyncholacis* con 25 especies y *Podostemum* con 10 especies (Philbrick & Novelo, 1995).

Las Podostemaceae es la única familia americana de angiospermas que crecen adheridas a un sustrato rocoso en ríos con rápidos y de agua clara. Es de amplia distribución, principalmente en las regiones tropicales y subtropicales de América, África, Madagascar, este de Asia y Australia (Cook, 1990). Muy pocas especies habitan en zonas templadas, como lo son: *Podostemum ceratophyllum* Michx., que se distribuye del sur de Canadá hasta la región oeste de los Estados Unidos (Philbrick & Crow, 1983), mientras que en Japón se distribuyen algunas especies de los géneros *Hydrobryum* y *Cladopus* (Philbrick, 1984).

La morfología del desarrollo y la diversidad estructural en Podostemaceae es muy marcada. Asumiendo que las Podostemaceae derivaron de una planta típica cormofítica con el clásico modelo raíz-tallo (cRs), Rutishauser (1997) señala para esta familia una dinámica evolutiva del desarrollo de las estructuras vegetativas, como: la formación de estructuras crustáceas resultado del aplanamiento dorsiventral de las raíces, tallos o ambos; reducción o pérdida de la cofia de las raíces; la presencia de rizoides que secretan una sustancia adhesiva y frecuentemente de un disco adhesivo; formación de órganos a partir de meristemas de tipo endógeno o exógeno. Debido a esta peculiar morfología, Les *et al.* (1997) consideran que las relaciones filogenéticas de estas plantas acuáticas son difíciles de conocer debido a la adaptación a los hábitats típicamente acuáticos que van acompañados de importantes reducciones morfológicas y modificaciones que pueden oscurecer e incluso eliminar caracteres taxonómicamente útiles.

El alto grado de especialización, diversidad y endemismo de las podostemáceas, interesó a numerosos taxónomos desde que se reconoció por primera vez esta familia por Richard (1815), quien la designó como Podostemeae.

Royen (1951) realizó la revisión taxonómica de la familia Podostemaceae en el Nuevo Mundo. Hasta ese entonces, se le ubicaba en el orden Podostemales Lindley, con una sola familia Podostemaceae Rich. ex C. Agardh, él reconoció dos subfamilias: la subfamilia Podostemoideae con las tribus Mourereae y Eupodostemeae y la subfamilia Tristichoideae con las tribus Tristicheae y Weddellinae. Otros taxónomos las consideran como dos familias distintas: Tristichaceae y Podostemaceae (Willis 1915, 1926; Cusset & Cusset, 1988).

El número de taxa en la familia varía de acuerdo con el autor, debido a que la delimitación de los géneros y especies en la familia presenta aún serias dificultades, tal es el caso del género *Marathrum*, que muestra un polimorfismo vegetativo importante. Un factor relevante que dificulta el estudio de las podostemáceas es su complicada colecta y a la escasez de botánicos interesados en este tipo de plantas, lo cual se refleja en colecciones de herbario incompletas, que impiden y limitan los trabajos taxonómicos (Novelo & Philbrick, 1993).

En México, hasta el momento se han reportado 5 géneros y 8 especies (Philbrick & Novelo, 1997). *Marathrum* Humb. & Bonpl. (*Marathrum rubrum* Novelo & Philbrick, *M. schiedeanum* (Cham.) Tul, y *M. tenue* Liebm.), *Oserya* Tul. & Wedd. (*O. coulteriana* Tul., y *O. longifolia* Novelo & Philbrick), *Podostemum* Michx. (*P. ricciiforme* (Liebm.) P. Royen), *Tristicha* Du Petit Thouars (*T. trifaria* (Bory ex Willd.) Spreng.) y *Vanroyenella* Novelo y Philbrick (*Vanroyenella plumosa* Novelo & Philbrick).

Los estudios citogenéticos realizados en la familia Podostemaceae son muy escasos, y han sido dirigidos principalmente a la determinación del número cromosómico, dichos estudios representan sólo el 18,4% de los géneros y un 4.8% de las especies. Cronquist (1981), tomando en cuenta los conteos realizados hasta esa fecha, propuso para la familia Podostemaceae un número básico de  $x = 10$ , posteriormente Okada (1991) sugirió un  $x = 5$ .

Respecto a la citogenética de las podostemáceas mexicanas, Oropeza *et al.* (1998), reportaron que el número cromosómico para el género *Marathrum* es de  $2n = 28$  en todas las poblaciones analizadas y con un número básico de  $x = 14$ .

Con base en el conocimiento que se tiene hasta el momento, el propósito de este trabajo es aportar información a nivel citogenético para los distintos géneros presentes en México y de esta manera contribuir en el estudio sistemático de esta importante familia.

## ANTECEDENTES

### I. Generalidades de la familia Podostemaceae

#### Descripción

Hierbas anuales o perennes. Raíces de forma acintada, taloides o foliosas, usualmente fotosintéticas con rizoides en la superficie inferior. Tallo muy reducido u originándose lateralmente a lo largo de las raíces, opuestos o subopuestos. Hojas ausentes, presentes o reducidas, extremadamente variables en tamaño y forma; estípulas presentes o ausentes. Flores solitarias o en inflorescencias, pediceladas, envueltas por una espátela o por algunas hojas, o varias flores dentro de una sola espátela; hermafroditas, actinomorfas o zigomorfas. Perianto cuando presente, 3, 5-lobado, o reducido a tépalos parecidos a escamas; tépalos 2 a numerosos, usualmente alternando con los estambres. Estambres de 1 a numerosos, en 1 ó 2 verticilos completos o en un verticilo incompleto confinado a un lado de las flores, libres o unidos, algunas veces 2 ó raramente 3 ó 4 estambres nacen en un andropodio; filamentos comúnmente decíduos después de la antesis o persistentes y endurecidos; anteras basifijas o dorsifijas, con dehiscencia longitudinal con 2 aberturas, introrsas o extrorsas; polen en monadas, diadas o en grupos; ovario súpero, 1, 3-locular, algunas veces asentado sobre un ginóforo corto, carpelos iguales o desiguales; placenta axilar con 2 a numerosos óvulos anátropos; estigmas de 1 a 3, muy variables en forma y tamaño; fruto una cápsula, con 2 ó 3 valvas, valvas externamente acostilladas, aquilladas o lisas; semillas 2 a numerosas, sin endospermo. Crecen en cascadas, en ríos con rápidos, en aguas claras, adheridas a rocas u otros objetos sólidos. (Esta descripción esta basada en Novelo & Philbrick, 1997).

#### Historia taxonómica

Richard (1815) reconoce por primera vez a la familia Podostemaceae e incluye a los géneros *Marathrum* y *Podostemum*, colocándola dentro de las monocotiledóneas, junto a las Juncaceae, Butomaceae y Alismataceae. Crecen en cascadas, en ríos con rápidos, en aguas claras, adheridas a rocas u otros objetos sólidos

Lindley (1830) sugirió que la familia Podostemaceae debería estar ubicada dentro de las dicotiledóneas, considerando su tipo de hábitat y la venación de las hojas. Esta hipótesis la confirmaron Schleiden (1839) y Gardner (1847) al comprobar que los embriones presentan dos cotiledones.

Warming (1890) y otros autores la situaron dentro del orden Rosales. Posteriormente, Hutchinson (1926) ubica a las Hydrostachyaceae y Podostemaceae en el orden Podostemales entre las Sarraceniales y Caryophyllales. Pero posteriormente los estudios embriológicos realizados por Mauritzon (1933) revelaron que las Podostemaceae presentan una relación estrecha con Saxifragaceae, Crassulaceae y Rosaceae.

Royen (1951) realizó la revisión taxonómica de este grupo de plantas en el Nuevo Mundo y propuso dividir a la familia Podostemaceae en dos subfamilias (Podostemoideae y Tristichoideae) cada una compuesta por dos tribus, tomando en cuenta la forma del perianto, la posición y el número de flores, presencia de envolturas florales (espatela), la posición y el tamaño de las hojas. Este autor sugirió que las Podostemaceae, Crassulaceae y Rosaceae forman el estado final de tres líneas divergentes que se originaron en el grupo de las Saxifragaceae, y las reconoce como un grupo natural que debería estar separado de las Rosales y constituir su propio orden. Willis (1915) y más tarde Cusset & Cusset (1988) proponen elevar la subfamilia Tristichoideae a rango de familia.

En la última década, numerosos taxónomos han realizado diferentes estudios para tratar de esclarecer las relaciones filogenéticas de las Podostemaceae. Romo *et al.* (1993) llevaron a cabo un análisis fitoquímico en cinco especies que representan cinco géneros distintos de podostemáceas americanas, los componentes químicos presentes en este grupo de plantas, tienen una limitada distribución dentro de las angiospermas, lo que refuerza la idea de que se trata de un grupo taxonómicamente aislado, al compararlo con los análisis de otros grupos cercanos, concluyendo que la familia Podostemaceae se encuentra más estrechamente relacionada con Crassulaceae y Saxifragaceae. Por su parte Udeal *et al.* (1997) estudiaron las relaciones filogenéticas de tres especies que representan dos géneros de podostemáceas asiáticas, analizando secuencias de nucleótidos (de genes de *rbcL*), junto con numerosos grupos de angiospermas, sus resultados apoyan la hipótesis de que la familia se derivó de las Saxifragaceae y Crassulaceae, y

estas últimas son el grupo hermano de las Podostemaceae. Les *et al.* (1997) investigaron la filogenia de este grupo de plantas acuáticas por comparación de secuencias de ADN del gen que codifica para cloroplastos (*rbcL*), utilizando 8 especies, que representan 8 géneros Americanos de podostemáceas y los comparan con 84 géneros del grupo de las angiospermas y 11 géneros de plantas sin semillas. Sus resultados apoyan la clasificación de que este grupo de plantas esta constituido por familias separadas, Tristichaceae y Podostemaceae y también apoya una estrecha relación entre las familias Hydrostachyaceae y Podostemaceae como taxa hermanos, que se encuentran relativamente cerca de las familias Crassulaceae y Haloragaceae.

Hasta el momento, la clasificación taxonómica comúnmente usada en floras regionales por numerosos autores reconocen dos subfamilias, Tristichoideae y Podostemoideae (Royen, 1951; Takhtajan, 1980). Sin embargo, los estudios realizados por Willis (1915), Cusset & Cusset (1988), Les *et al.* (1997), apoyan la separación de Tristichoideae a nivel de familia. En este trabajo se utilizará la clasificación de Royen (1951).

### Hábitat y ecología

La familia Podostemaceae, se desarrolla básicamente en los trópicos, en un tipo de hábitat único para las angiospermas: adheridas a las rocas, en los ríos y pequeñas caídas de agua (Philbrick & Novelo, 1995). Las características generales de la historia de vida de las Podostemaceae reflejan la naturaleza del hábitat estacional en el cual se presentan (Novelo & Philbrick, 1993). Debido a que los niveles de agua de los ríos cambian periódicamente, en época de lluvias el nivel es alto, mientras que en época de secas el nivel es bajo, durante el primer período ocurre el máximo crecimiento vegetativo cuando las plantas están totalmente sumergidas en aguas bien aereadas y en áreas iluminadas con luz solar directa. La floración es aérea y ocurre únicamente cuando los niveles de agua descienden; se ha reportado polinización anemófila y entomófila (Novelo & Philbrick, 1993).

El fruto capsular de las Podostemaceae requiere desecación para la dehiscencia, el cual deja caer las semillas sobre las rocas. Su dispersión puede ser por agua en un mismo río y se cree que entre sistemas de ríos podrían ser por aves. Una vez sobre la roca, la capa más externa de la

cubierta de la semilla se expande al ser hidratada y se forma un mucílago que al secarse, se adhiere firmemente al sustrato (Royen, 1951; Novelo & Philbrick, 1993).

El crecimiento vegetativo máximo de las podostemáceas ocurre cuando la planta está sumergida, así las hojas más grandes se encuentran antes de la floración. Sin embargo, cuando las plantas están expuestas, comienza la floración y las hojas maduras frecuentemente se pierden. Finalmente, en el momento de la maduración de la cápsula, las hojas tienen ya demasiado tiempo de haber desaparecido. Lo anterior hace necesario visitar una población repetidamente para observar todas las fases del ciclo de vida (Novelo & Philbrick, 1993).

### Importancia

Las podostemáceas son utilizadas como forraje durante la temporada de secas en países como Colombia y Panamá. En otros, se utilizan como alimento para peces o como ensalada en la dieta humana (Royen, 1951). En el Amazonas se utilizan algunas especies como sazón de comida, una de éstas es *Rhyncholacis*, cuyas hojas son secadas y pulverizadas y se usan como sustituto de la sal. En algunos lugares de México, algunas especies de *Marathrum* son empleadas como medicinales contra enfermedades del hígado (Philbrick & Novelo, 1995).

### Endemismo

Royen (1951), Cook (1990) & Philbrick y Novelo (1993) destacan el alto porcentaje de endemismo para la familia Podostemaceae. Philbrick & Novelo (1995) estiman en 48% el endemismo para las especies del Nuevo Mundo. Alrededor de 14 de los 19 géneros del continente americano tienen especies endémicas. Algunos géneros monotípicos como *Ceratolacis*, *Devillea* y *Vanroyenella* son localmente endémicos. Los géneros *Apinagia*, *Castelnavia*, *Oserya* y *Rhyncholacis* presentan más del 50% de especies endémicas, pero también se conocen endemismos en *Janmaniella*, *Marathrum*, *Mourera* y *Podostemum* (Philbrick & Novelo, 1993).

Alrededor de un 50% de las especies presentes en México son endémicas, lo cual se describe en los siguientes apartados.

## Géneros presentes en México

Recientemente, Novelo & Philbrick (1997) realizaron el inventario de las podostemáceas en la mayor parte de la República Mexicana, en donde encontraron 5 géneros y 8 especies. Según la clasificación de Royen (1951), en México se encuentran representados cuatro géneros de la subfamilia Podostemoideae: *Marathrum* Humb. et Bonpl., *Oserya* Tul., *Podostemum* Michaux, y *Vanroyenella* Novelo y Philbrick, mientras que la subfamilia Tristichoideae solamente incluye al género *Tristicha* Du Petit-Thouars.

*Marathrum* es uno de los géneros americanos con mayor diversidad, está compuesto por 25 especies distribuidas en las Antillas Mayores, México y Centroamérica, hasta el noroeste de Sudamérica. En México, es el más diverso y tiene tres especies; *M. rubrum* Novelo y Philbrick, *M. schiedeanum* (Cham.) Tul. y *M. tenue* Liebmann (Novelo & Philbrick, 1997). *Marathrum rubrum* es endémico a las partes bajas de la vertiente del Pacífico Mexicano, en los estados de Jalisco y Guerrero, hasta los 400 m de altitud. *Marathrum schiedeanum* es de amplia distribución, alcanza hasta los 1000 m de altitud, desde Nayarit a Chiapas por el Pacífico y, en Veracruz por el Atlántico. *Marathrum tenue* es común en las costas del Atlántico, en la zona del centro y en la parte sur de las costas del Pacífico Mexicano, alcanza regiones de climas más templados a una altitud cercana a los 1500 m.

De acuerdo con Royen (1954) y Novelo & Philbrick (1995), *Oserya*, es un género americano constituido por siete especies, cinco de las cuales se encuentran en el norte de Brasil y el noreste de Sudamérica. Poco se conoce de la distribución geográfica de las especies sudamericanas de *Oserya*, debido a que cuatro son conocidas solamente de las colecciones tipo. En México, el género *Oserya* está constituido por dos especies endémicas al Pacífico Mexicano; *O. coulteriana* Tul. y *O. longifolia* Novelo & Philbrick.

*Oserya coulteriana* en México, se distribuye en la costa del Pacífico desde Sonora hasta Guerrero, en el centro de México principalmente en Morelos y en Baja California Sur. Alcanza hasta los 2000 m de altitud. Mientras que *Oserya longifolia* también es endémica a México y sólo se conoce de la localidad tipo en el estado de Jalisco. Alcanza los 300 m de altitud.



*Podostemum* es un género esencialmente pantropical constituido por cerca de 17 especies. Se distribuye desde el noreste de Norteamérica y las Antillas, de México hasta Centroamérica y en Sudamérica en Brasil, Argentina y Uruguay (Royen, 1954).

*Podostemum ricciiforme* es endémico de la vertiente Atlántica de México, en los estados de Oaxaca, Puebla, Tabasco y Veracruz. Alcanza hasta los 1500 m de altitud. En el estado de Veracruz crece en ríos ricos en nutrientes. La eutroficación parece debida a aguas residuales de origen doméstico e industrial (Quiroz *et al.*, 1997). De acuerdo a los autores, en condiciones eutróficas existe un bajo índice de floración y no se encuentran frutos.

El género *Vanroyenella* es endémico a México. Está compuesto por una sola especie *V. plumosa* Novelo & Philbrick y se le conoce únicamente de los estados de Jalisco y Guerrero.

En el continente americano el género *Tristicha* está representado por una sola especie, *Tristicha trifaria* (Bory ex Willd.) Spreng. Esta especie se encuentra ampliamente distribuida en la parte tropical y subtropical de América y África; en México se distribuye desde Nayarit a Chiapas por el Pacífico y desde San Luis Potosí al suroeste de Veracruz y Tabasco por el Atlántico, y en la zona centro en los estados de México y Morelos, hasta los 1300 m de altitud.

En el tabla 1 se muestran algunas de las características morfológicas que distinguen a los cinco géneros presentes en México.

Tabla 1. Características diagnósticas de los géneros mexicanos de la familia Podostemaceae.

Carácter	Géneros				
	<i>Marathrum</i>	<i>Oserya</i>	<i>Podostemum</i>	<i>Tristicha</i>	<i>Vanroyenella</i>
HÁBITO					
Duración	Anual	Perenne	Perenne	Perenne	Anual
HOJA					
Forma	Repetidamente pinnadas o divididas	Repetidamente dividida	Entera o repetidamente dividida	Entera (parecidas a escamas)	Pinnada
FLOR					
Estructura de protección	Espatela	Espatela	Espatela	Brácteas	Espatela
No. de flores por inflorescencia	1(2)	1	1	1	(2)8-12
ESTAMBRES					
Número	2-9(11)	(1)2(3)	(1)2(3)	1(2)	2
Andropodio	Ausente	Presente	Presente	Ausente	Ausente
OVARIO					
No. de loculos	2	2	2	3	2
No. de estigmas	2	2	2	3	2
FRUTO					
No. de valvas por fruto	2	2	2	3	2
POLEN					
Asociación	Monadas	Monadas	Diadas	Monadas	Monadas
No. y tipo de aberturas	Tricolpado	Tricolpado a pentacolpado	Tricolpado	Pantoporado	Tricolpado

## II. Citogenética

La citogenética es la ciencia que estudia la correlación de las características genéticas y citológicas de los organismos. Se fundamenta en los siguientes tres puntos esenciales: a) los genes están situados en los cromosomas; b) su ordenación sobre los mismos es lineal; y c) al fenómeno genético de la recombinación le corresponde un fenómeno citológico de intercambio cromosómico (Wilson, 1896 citado por Lacadena, 1988). De acuerdo a lo anterior, la citogenética estudia la regularidad de la distribución de los genes de célula a célula (mitosis), de generación a generación (meiosis), así como su origen y la relación con la transmisión y la recombinación génica (Sáez y Cardoso, 1978; García, 1990). Es una importante herramienta en estudios biosistemáticos y es usada para lograr un mejor entendimiento de las relaciones filogenéticas y las tendencias evolutivas de los distintos niveles taxonómicos. De acuerdo con García (1985), el estudio del comportamiento de los cromosomas puede dar importantes indicios sobre los procesos evolutivos que han operado en los seres vivos, así como de los cambios genéticos que han dado lugar a la formación de especies.

Por lo tanto, el estudio integral de una especie requiere del análisis de manera conjunta de la mayor cantidad de características cariológicas, como son los números cromosómicos, estudios del cariotipo, bandeo cromosómico, comportamiento de los cromosomas meióticos, longitud total de la cromatina y contenido de ADN (Jackson, 1971; Bennett, 1984; Kenton, 1986). Singh (1993) señaló que la nomenclatura y las relaciones de las especies basada en la taxonomía clásica pueden ser verificadas por medio de evidencias citogenéticas, como el análisis cariotípico, el grado de entrecruzamiento, la viabilidad de híbridos, el comportamiento en meiosis, los procedimientos bioquímicos y la caracterización molecular. Sin embargo, las relaciones filogenéticas entre especies y su clasificación, pueden ser mejor entendidas utilizando diferentes disciplinas como la morfología, anatomía, palinología, citogenética, bioquímica, etc. (Stace, 1980; Singh, 1993).

## Cromosomas mitóticos

Los cromosomas son entidades permanentes del núcleo celular, su aspecto depende del estado fisiológico en que se encuentre la célula, pueden estar en forma de delgados filamentos como se presentan en interfase nuclear o bien como elementos de forma y tamaño característicos en las fases finales de la división celular (Sáez y Cardoso, 1978). Su función es el almacenamiento, duplicación y transmisión de la información hereditaria en unidades llamadas genes a través de los procesos de mitosis y meiosis (Stebbins, 1971; Robertis y Robertis, 1990).

Los cromosomas mitóticos son observados en células somáticas obtenidas de tejido meristemático, las cuales son sometidas a tratamientos con diversos mitostáticos, previos a la fijación y tinción (García, 1990; Mercado & Lira, 1994). Con esta técnica, se obtiene el número cromosómico somático ( $2n$ ) de una planta ó un grupo de plantas relacionadas, la estructura de los cromosomas o cariotipos, así como los niveles de poliploidía (Palomino, 1995). La información obtenida permite determinar el número básico ( $x$ ) de grupos de ligamiento génico y cuántas veces se repiten, proporcionando un indicador rápido de la similitud génica entre poblaciones y especies (Kenton, 1986).

## Cariotipo e idiograma.

El cariotipo es la apariencia fenotípica del complemento cromosómico particular de un individuo o grupo afín de individuos y está definido tanto por el número como por la forma de los cromosomas en metafase mitótica (Lewistky, 1931; Stebbins, 1971; John, 1976). La morfología de los cromosomas se describe con base en seis características: número básico ( $x$ ), tamaño absoluto, tamaño relativo, relación de brazos, número y tamaño de constricciones secundarias, distribución y tamaño de segmentos hetero y eucromáticos (García, 1990).

El número básico representa el número haploide más pequeño de cromosomas de una serie poliploide (Rieger *et al.*, 1982) y es una de las características mejor conocidas y la más utilizada en la determinación de la posición taxonómica y filogenética de las especies. Géneros, especies e incluso familias relacionadas, poseen a menudo números cromosómicos del mismo orden de magnitud (Morán, 1949; White, 1957). Stace (1980) señala que el conteo cromosómico

es la evidencia biosistemática que más se utiliza en los estudios taxónomicos de las floras modernas, sin embargo, esta información está disponible sólo para un 15% a 20% de las plantas vasculares y es menor para familias de plantas tropicales.

La posición del centrómero (también llamada constricción primaria) se caracteriza por su gran constancia y constituye un marcador útil en la identificación morfológica de los cromosomas, de acuerdo a esta característica Levan *et al.* (1964), clasifican a los cromosomas en cuatro grupos: m (metacéntricos), sm (submetacéntricos), st (subtelocéntricos) y t (telocéntricos). Cada uno de estos grupos se caracteriza por una magnitud definida de su relación de brazos.

La determinación del cariotipo también toma en cuenta otras características para clasificar a los cromosomas como son: tamaño absoluto, se refiere a la longitud y al diámetro (expresado en micrómetros) del total y de cada uno de los cromosomas; tamaño relativo, es la relación que guarda la longitud de un cromosoma particular con respecto a los demás y al total del genomio, esta es una característica constante y permite la identificación y clasificación del complejo cromosómico. Esta relación puede ser estimada como el porcentaje con respecto a la longitud total del genomio tomado como 100%, esto permite visualizar más claramente las diferencias o similitudes entre los cromosomas de genomios o especies diferentes. Relación de brazos, la morfología cromosómica es determinada por la posición del centrómero (García, 1990). Los distintos pares de cromosomas se arreglan en orden decreciente de tamaño y se numeran progresivamente, partiendo de uno para el par más largo (García, 1990).

Otros marcadores útiles son las constricciones secundarias, que consisten de estrechamientos de la longitud del cromosoma en donde su posición y tamaño son constantes y en la mayoría de los casos están estrechamente relacionados con el lugar en que se encuentra el organizador nucleolar. El número de cromosomas que presentan constricciones secundarias de cada célula varía de una especie a otra. La presencia de por lo menos una constricción secundaria asociada a un NOR garantiza que se produzca la síntesis protéica. Debido a que la región organizadora nucleolar (NOR) está constituida por un conjunto de copias de genes que codifican para la síntesis el ARN 45S precursor del ARN ribosómico (ARNr), el cual posteriormente sera procesado y formara parte de la subunidad grande del ribosoma maduro. Por lo tanto su función

esta asociada con la lectura del ARN-m y la realización del enlace polipeptídico durante el proceso de traducción que se lleva a cabo en los ribosomas. Un segmento cromosómico separado del cuerpo principal del cromosoma mediante una constricción secundaria, se denomina satélite y puede ser terminal o intercalar (Lacadena, 1988; Rieger *et al.*, 1982).

El análisis de los cariotipos se realiza mediante representaciones gráficas, los cariogramas (microfotografías o dibujos) e idiogramas (barras con la posición relativa del centrómero), su comparación tiene como objetivo mostrar el grado de homología entre los genomas de las especies, esta información permite elaborar hipótesis sobre como surgieron estas variaciones en el curso de la evolución de los grupos en estudio y de establecer las posibles relaciones entre los diferentes niveles taxonómicos (García, 1990).

### Poliploidía

Las diferencias en los cariotipos proporcionan información sobre los cambios que han ocurrido a nivel cromosómico (Jones, 1978). Los cambios numéricos en el cariotipo que involucran sólo un cromosoma provocan aneuploidías y los que afectan a todo el complemento cromosómico provocan poliploidías. Las alteraciones en el número de cromosomas, es el resultado de fisiones centroméricas, fusiones céntricas, aneuploidías y poliploidías (Rieger *et al.*, 1982; García, 1990). La poliploidía implica la duplicación de todo el complemento cromosómico, ya sea por la supresión de la citocinesis, o bien por la formación de gametos con un número no reducido de cromosomas, cuando la duplicación se presenta en la misma especie se denomina autopoliploidía, cuando ocurre por hibridización, es decir, la unión de genomas de dos o más especies distintas, con posterior duplicación de los mismos se denomina alopoliploidía (Swason *et al.*, 1968; Sáez y Cardoso, 1978).

La poliploidía ha jugado un papel muy importante en la formación de la diversidad de especies vegetales, se calcula que cerca de la mitad de las especies de angiospermas derivaron de un ancestro poliploide (Soltis, 1998). Los dos principales modos de origen de la condición poliploide son la duplicación somática en la mitosis y la no reducción en la meiosis (Grant, 1989). Diferentes autores han buscado una explicación al éxito de la poliploidía en la evolución

vegetal, algunas causas sugeridas son: el incremento del tamaño, colonización y/o capacidad competitiva, versatilidad bioquímica y heterocigosidad (Grant, 1989; Soltis, 1998).

La poliploidía también proporciona propiedades de amortiguamiento a los genotipos, tanto de autopoliploides como de alopoliploides, en comparación con los diploides originales, debido a la presencia de numerosas duplicaciones (Grant, 1989).

De acuerdo a Grant (1989) la alopoliploidía es más frecuente que la autopoliploidía, la alopoliploidía es un sistema genético que permite que un híbrido de especie pase la barrera de esterilidad y lleve a cabo una cruce efectiva para su constitución híbrida, de esta manera, permite a las plantas explotar las ventajas intrínsecas de un genotipo altamente heterocigótico. Al respecto Soltis (1998) mencionó que nuevas evidencias indican que las especies poliploides son producto recurrente de formación poliploide, lo cual introduce adicional diversidad genética dentro de los genomas de especies poliploides. Adicionalmente, las nuevas combinaciones genéticas que se originen por reorganización genómica siguiendo la formación poliploide confieren una mayor diversidad genética y contribuyen al éxito de los poliploides naturales.

### Evolución del cariotipo

El análisis citogenético ha permitido a los taxónomos, evolucionistas, citogenetistas, biólogos moleculares y fitomejoradores avanzar en el estudio sobre el grado de relación entre los taxa y sus patrones de divergencia (Kenton, 1986; Singh, 1993). El estudio comparativo de los cariotipos muestra las diferencias cromosómicas entre especies, da indicios de cómo surgieron estas diferencias en el curso de la evolución y apoya las teorías de las relaciones filogenéticas de los organismos (Stebbins, 1971; García, 1990).

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

recíprocas originando un cariotipo más heterogéneo. Lo anterior se basa en los estudios realizados por Lewitzky (1931) en la subfamilia Helleboreae (Ranunculaceae), en donde encontró que los cariotipos más simétricos están asociados a los individuos morfológicamente más primitivos, mientras que los cariotipos más asimétricos, están asociados a los individuos más especializados. En las angiospermas existe la tendencia hacia el incremento de la asimetría de los cariotipos, como se observó en *Aster* y *Haplopappus* (Stebbins, 1971).

García (1990) mencionó que los términos, número fundamental (n.f.) y la simetría-asimetría, apoyan la definición de las tendencias o patrones de evolución de los grupos de plantas. El número fundamental (n.f.) se refiere al número total de brazos mayores que forman un cariotipo: dos por cada cromosoma metacéntrico y uno por cada acro- y telocéntrico. El término de simetría-asimetría se refiere a las diferencias de tamaño y de relación de brazos entre los cromosomas no homólogos de un genomio.

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

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

Por otro lado, la poliploidía y la formación de descendencia híbrida han sido factores cromosómicos importantes dentro de la evolución de las angiospermas (Moore, 1979; Rieger *et al.*, 1982; Gardner *et al.*, 1991). Es posible inducir la poliploidía empleando sustancias como la colchicina, óxido nitroso, etc., las cuales inhiben la formación del huso acromático e interfieren



en la división celular. Desde los puntos de vista teórico y práctico, son muchas las posibilidades que ofrece la producción experimental de poliploides (Robertis y Robertis *et al.*, 1990; Gardner *et al.*, 1991).

### Citotipos

Son las variaciones cuantitativas (número cromosómico) o cualitativas (estructura cromosómica) del complemento estándar de una especie, pueden presentarse en individuos o en poblaciones diferentes de la misma especie (Rieger *et al.*, 1982; Araki, 1985; Palomino & Martínez, 1994; Martínez & Palomino, 1997). Las variaciones son causadas por traslocaciones, intercambios heterocigóticos o deleciones (Araki *et al.*, 1976). La presencia de citotipos ha sido observada en algunos géneros. Araki (1975; 1985) y Araki *et al.*, (1976) reportaron 46 poblaciones naturales de *Scilla scilloides*, en las que encontraron tipos diploides, poliploides y aneuploides. El origen de la variación sólo puede ser analizada en metafase I (M1) y anafase I (A1) de la meiosis.

### Cromosomas meióticos

Los cromosomas meióticos son comúnmente observados en las células madres del polen (CMP) contenidas en las anteras de los botones florales. La técnica consiste en el maceramiento de anteras, tinción con acetorceína y observación en fresco al microscopio de luz (Palomino, 1986; García, 1990). El análisis de los cromosomas meióticos, así como el comportamiento de los mismos, permite conocer el número y complemento haploide ( $n$ ) de una especie en particular, colaborando al establecimiento del número básico de un grupo de plantas (Palomino, 1986). En la meiosis se analiza el número y posición de los quiasmas que mantienen unidas a las cromátidas en fase de diploteno hasta la metafase I (M1), detectando la formación de univalentes, bivalentes, tetravalentes o multivalentes. Esta información puede indicar el origen de alopoloides, autoploides, cambios Robertsonianos o rearrreglos cromosómicos que afectan el comportamiento reproductivo y el patrón de variación de las poblaciones, así como los eventos que se han llevado a cabo en la

evolución del cariotipo y las relaciones evolutivas en el nivel genómico (García, 1985; Palomino, 1986).

### Estudios del contenido de ADN nuclear

Otro parámetro importante en la caracterización de los genotipos es la cuantificación de ADN. Existen numerosos datos que demuestran la variación en el contenido de ADN absoluto por genoma, tanto de especies silvestres como en cultivadas de los diferentes grupos de angiospermas (Bennett & Smith, 1976; Price 1976; Cavallini & Natali, 1991). Los estudios respecto al contenido de ADN nuclear son importantes para el establecimiento de relaciones filogenéticas y evolutivas de los distintos taxa (Bennett & Smith, 1976; Price 1976, 1988; Dickson *et al.*, 1992), este carácter afecta un amplio rango de características moleculares, celulares y a toda la planta a partir de la replicación del ADN nuclear, por lo tanto se relaciona con el rango de crecimiento, hábitat y con el tiempo de generación (Bennett, 1985, 1987) y de manera integral con factores adaptativos medioambientales y ecológicos (Grime *et al.*, 1985; Wyman *et al.*, 1997).

La cantidad de ADN de los núcleos haploides (ADN no replicado) de un organismo es designado como el valor-C (Swift, 1950). El rango de la variación registrada es de 100 veces entre las angiospermas, el menor pertenece a *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. (Brassicaceae) con 0.2 pg y el máximo a *Fritillaria assyriaca* Bake (Liliaceae) con 127.4 pg (Bennett & Leitch, 1997). En numerosos estudios sobre angiospermas, el tamaño del genoma nuclear es estimado midiendo la longitud total de la cromatina (LTC), en lo que se encontró que el contenido de ADN del genoma está positivamente correlacionado con la LTC y el volumen de los cromosomas (Bennett *et al.*, 1983). Posteriormente se desarrollaron técnicas más precisas para determinar el valor C-ADN utilizando un microdensitómetro el cual detecta un espectro de absorbancia del ADN teñido con Feulgen y se compara con el contenido de ADN de un testigo conocido (uno de los más utilizados es *Hordeum vulgare* var. *sultan*) expresado en picogramos (Bennett & Smith, 1976; Kenton, 1984; Price, 1988; Cavallini & Natali, 1991; Creber *et al.*, 1994). En estudios más recientes sobre el contenido de ADN en plantas, se implementó una técnica novedosa, la citometría de flujo (Galbraith *et al.*, 1983; Dolezel, 1991, 1995, 1997a; Bennett & Leitch, 1997).

La citometría de flujo (CF) es una técnica analítica que permite la medida simultánea de varios parámetros de la misma partícula (células, núcleos, cromosomas, etc.). Las partículas deben estar en suspensión, y son analizadas de una en una en el seno de un flujo, a una velocidad de 30-50 partículas por segundo. El flujo de partículas en su recorrido intercepta un rayo de luz muy focalizado, el impacto del rayo con una partícula genera señales ópticas que son recogidas por detectores, filtradas y convertidas en impulsos eléctricos. La fluorescencia emitida por las partículas es analizada utilizando una computadora (Dolezel *et al.*, 1992; Dolezel, 1995; 1997a).

La citometría de flujo (CF) fue desarrollada originalmente como un método rápido para la cuantificación y análisis de células sanguíneas de animales y humanos para medir numerosos parámetros celulares como el contenido de ADN, proteínas, enzimas, antígenos y volumen celular (Melamed *et al.*, 1979; Dolezel, 1997b). La CF en plantas fue establecida por De Laat & Blaas (1984), quienes analizaron y clasificaron los cromosomas de *Haplopappus gracilis*. A partir de estos estudios, surgieron innumerables trabajos en tejidos vegetales debido a que permite un análisis rápido y preciso en grandes poblaciones celulares y organelos celulares. Estas ventajas se ven reflejadas en su uso extensivo en plantas de importancia económica, así como en investigaciones básicas y aplicadas (Dolezel, 1991, 1995, 1997b; Dolezel *et al.*, 1995).

Para la lectura por citometría de flujo, los núcleos son teñidos con fluorocromos que se unen específicamente al ADN. Las células son inyectadas en un flujo líquido laminar y pasan una a una por un punto de medida iluminado con una luz de alta intensidad. Cada célula en el punto de interacción produce una señal fluorescente que es de intensidad proporcional a su contenido en fluorocromo (Dolezel, 1995).

El contenido de ADN por citometría de flujo es detectado y medido utilizando colorantes fluorescentes que se unen específicamente y estequiométricamente al ADN. Algunos se intercalan cuantitativamente entre los pares de bases de la doble cadena de ácidos nucleicos como: el bromuro de etidio (BE), ioduro de propidio (IP) o naranja de acridina. Mientras que otros se unen selectivamente a regiones ricas en adenina-timina, DAPI (4',6 Diamidino- 2-fenilindole), DIPI, Hoechst 33258, Hoechst 33342, o regiones ricas en guanina-citocina como mitramicina (MI), cromomicina A3 (CH), olivomicina (Dolezel, 1991; Dolezel *et al.*, 1992).

El análisis e interpretación de los resultados se basa en la alineación y calibración adecuada del citómetro, utilizando microesferas comerciales, núcleos aislados de eritrocitos de pollo o pescado, debido a que son materiales estables con valores determinados de fluorescencia o dispersión de la luz, así como en el de controles internos adecuados para la cuantificación de ADN y estudio del ciclo celular. Los controles internos son muestras celulares de plantas o animales diploides en suspensión de valores de contenido de ADN conocido (pg).

Para realizar estudios por CF, es necesario disponer de una suspensión de núcleos de tejidos vegetales (hojas, semillas, frutos, etc.) para analizar sus características y relacionar e interpretar los resultados obtenidos. Para esto la suspensión nuclear debe cumplir con los siguientes requisitos: representatividad del tejido, suspensiones celulares de alta calidad, con pocos agregados, restos celulares y un bajo coeficiente de variación (CV), preservación de las características nucleares y cantidad suficiente de la muestra de núcleos (Dolezel, 1995).

Las aplicaciones básicas de la CF en plantas superiores de acuerdo a Dolezel (1995) se resumen de la siguiente manera: análisis de ploídia, análisis de endoploídia, análisis del ciclo celular, determinación del tamaño genómico celular, estimación de la composición del genoma nuclear, estimación del contenido de bases del ARN nuclear, determinación del sexo en plantas dioicas, análisis de la estructura de la cromatina, efectos de la irradiación. Dolezel (1995) mencionó que las ventajas de la CF es la objetividad, alta sensibilidad, velocidad de análisis, obtención de mediciones multiparamétricas y la separación de subpoblaciones de partículas analizadas. En general, es posible analizar de forma rápida y precisa a partir de cromosomas aislados, el tamaño de cromosomas, índice centromérico, contenido de ADN, proporción de bases (AT/GC), clasificación de grandes cantidades de cromosomas de tipo simple para el aislamiento de genes y el mapeo.

### III. Estudios citogenéticos en la familia Podostemaceae

#### Números cromosómicos

La comprensión de la variación del número cromosómico dentro de la familia Podostemaceae puede proporcionar una idea del proceso evolutivo, y un apoyo como primer paso para estudios sistemáticos y filogenéticos (Les & Philbrick, 1993). Hasta el momento se dispone de muy poca información acerca de los números cromosómicos de la familia Podostemaceae, los conteos cromosómicos representan un 18.4% para los géneros y un 4.8% para las especies, de éste, un 6% corresponde a 3 géneros (6 especies) americanos.

Los primeros registrados sobre el número cromosómico en la familia Podostemaceae fueron realizados utilizando la técnica de cortes de botones florales con micrótomo de rotación, esta técnica no es la más conveniente para conocer el número cromosómico de un organismo, debido a que los cromosomas pueden doblarse durante la inclusión en parafina y los resultados obtenidos serían poco confiables. Esto probablemente se refleja en los conteos obtenidos en *Lawia zeylanica* (= *Dalzellia*) con  $2n = 20$  reportado por Magnus (1913), y el conteo posterior obtenido mediante la técnica de aplastamiento para esta misma especie con  $2n = 30$  por Uniyal & Mohan Ram (1994). Magnus (1913) y Gaiser (1930) indicaron el número diploide  $2n = \text{ca. } 40$  para *Podostemum subulatus*. Gaiser (1930) analizó dos especies del género *Oenone*, reportó los números haploides  $n = 12-14$  para *O. imthurni* y  $n = \text{ca. } 8$  para *O. versteegiana*. Chiarugi (1933) realizó el conteo de *Weddelina squamulosa*, en la que encontró un número diploide  $2n = 40$ , posteriormente confirmado por Darlington & Wylie (1955), con un número haploide  $n = 20$ . Okada (1991) registró los números diploides de las especies asiáticas *Cladopus nymanni* con  $2n = 30$  e *Indostristicha malayana* con  $2n = 20$ . Uniyal & Mohan Ram (1994) realizaron los conteos de otras tres especies asiáticas *Hydrobryopsis sessilis* con  $2n = 26$ , *Dalzellia zeylanica*  $2n = 20$  y *Polypleurum stylosum* con  $2n = 34$ .

A partir del análisis de los números cromosómicos Cronquist (1981) propuso para la familia Podostemaceae un número básico de  $x = 10$  y posteriormente Okada (1991) sugirió un  $x = 5$ .

Tabla 2. Números cromosómicos reportados para la familia Podostemaceae.

Taxon	Continente	<i>n</i>	<i>2n</i>	Referencia
<b>Subfamilia Podostemoideae</b>				
<i>Cladopus nymanii</i> H. Moeller	Asiático	*	30	Okada, 1991.
<i>Hydrobryopsis sessilis</i> Engl.	Asiático	*	26	Uniyal & Mohan Ram, 1994.
<i>Marathrum schiedeanum</i> (Cham.)Tul.	Americano	14	28	Oropeza <i>et al.</i> , 1998.
<i>Marathrum rubrum</i> Novelo y Philbrick	Americano	*	28	Oropeza <i>et al.</i> , 1998.
<i>Marathrum tenue</i> Liebmann	Americano	*	28	Oropeza <i>et al.</i> , 1998.
<i>Oenone imthurni</i> Goebel (= <i>Apinagia</i> ) Van Royen	Americano	ca. 12-14	*	Gaiser, 1930 citado en Federov, 1974.
<i>Oenone versteegiana</i> Went ex Pulle.	Americano	ca. 8	*	Gaiser, 1930 citado en Federov, 1974.
<i>Podostemum subulatus</i> Gardn.	Asiático	* *	40? ca.40	Magnus, 1913. Gaiser, 1930.
<i>Polypleurum stylosum</i> J.B. Hall	Asiático	*	34	Uniyal & Mohan Ram, 1994.
<b>Subfamilia Tristichoideae</b>				
<i>Indotristicha malayana</i> Dransf. & Whitmore	Asiático	*	20	Okada, 1991.
<i>Lawia zeylanica</i> Tul. (= <i>Dalzellia</i> ) Wight	Asiático	* 10 *	20 * 30	Magnus, 1913. Gaiser, 1930 citado en Federov, 1974. Uniyal & Mohan Ram, 1994.
<i>Weddelina squamulosa</i> Tul.	Americano	* 20	40 *	Chiarugi, 1933. Darlington & Wylie, 1955.

## Morfología cromosómica

Los estudios sobre el análisis cariotípico en podostemáceas son escasos. Okada (1991) realizó el análisis cariomorfológico de la especie asiática *Cladopus nymanii*, quien mostró un cariotipo de tipo bimodal, formado por 8 pares de cromosomas grandes y 7 pares de cromosomas chicos, en un rango de longitud del tamaño de los cromosomas de 0.5 a 2.0  $\mu\text{m}$ . Por su parte, Uniyal & Mohan Ram (1994) analizaron el cariotipo de 3 especies, utilizando la técnica de aplastamiento (squash) en meristemas de raíces en 3 taxa de la familia Podostemaceae que viven en Asia, dos de esas especies pertenecen a la subfamilia Podostemoideae, *Hydrobryopsis sessilis* la cual presentó una fórmula cariotípica formada por  $2n = 26, 3m+6sm+2st+2t$ , mientras que *Polypleurum stylosum* está constituida por  $2n = 34, 6m+7sm+2st+2t$ , por último la especie representante de la subfamilia Tristichoideae, *Dalzellia zeylanica* con  $2n = 30$ , presentó una fórmula cariotípica de  $6m+6sm+1st+2t$ . Recientemente Oropeza *et al.* (1998) llevaron a cabo el análisis cariotípico de tres especies del género *Marathrum* (subfamilia Podostemoideae) en México. En *M. rubrum* y *M. tenue* todos los cromosomas fueron metacéntricos y en *M. schiedeanum* el complemento cromosómico está formado por 11 pares de cromosomas metacéntricos y 3 pares de submetacéntricos. Aunque estos estudios no son suficientes para dar una idea general sobre la morfología de los cromosomas en las podostemáceas, son importantes ya que la fórmula cariotípica y la longitud total de la cromatina pueden indicar el papel de las alteraciones estructurales de los cariotipos durante su evolución.

#### IV. Germinación *in vitro* en la familia Podostemaceae

El cultivo de tejidos vegetales *in vitro* es una herramienta aplicada en la conservación de especies de importancia económica y especies en peligro de extinción (George, 1993). Esta metodología se fundamenta en la totipotencialidad celular, es decir, a partir de un conjunto de células de cualquier parte de la planta se pueden regenerar nuevas plantas (Bidwell, 1979; Curtis, 1986). La metodología por cultivo *in vitro* consiste en cultivar sobre un medio nutritivo, en

condiciones estériles, fragmentos de plantas (explantes), semillas, embriones, órganos, tejidos, células ó protoplastos de plantas (Curtis, 1986; Mateo-Sagasta, 1990).

La obtención de un buen cultivo depende en gran medida de los componentes físico-químicos del medio de cultivo que permitan el desarrollo adecuado de las plantas, los componentes básicos del medio son microelementos, macroelementos, una fuente de carbono y reguladores de crecimiento, pH, temperatura y fotoperíodo (Curtis, 1986; George, 1993). De igual importancia son, el tipo y estado fisiológico de la planta factores importantes en el estudio de la regeneración y estabilidad genética (George, 1993).

Existen diferentes medios de cultivo que varían en la concentración de sustancias. La elección del medio adecuado depende de los requerimientos de la especie a estudiar, así como de los objetivos del cultivo, ya sea inducción de callo, desarrollo de raíces, obtención de embriones somáticos, aunque el medio de cultivo más comúnmente usado es el desarrollado por Murashige & Skoog (MS) en 1962.

Los estudios de la familia Podostemaceae en condiciones de laboratorio son muy escasos, aunque algunos investigadores consideran la posibilidad de obtener plantas maduras mediante germinación *in vitro* como una oportunidad para comprender la biología de este peculiar grupo de plantas. El éxito de esta metodología proporcionaría una excelente oportunidad a morfólogos y ecologistas para estudiar e interpretar la estructura, desarrollo, fisiología y características adaptativas de este grupo de plantas (Vidyashankari & Mohan Ram, 1987).

Vidyashankari & Mohan Ram (1987) desarrollaron una metodología para el estudio de *Griffitella hookeriana* (Podostemaceae) por germinación de semillas *in vitro*. Ellos utilizaron pequeños cubos de unicel como sustrato en los que colocaron las semillas, estos cubos flotaban en el medio líquido de MS ( $1 \times 10^{-5}$ ) suplementado con 0.5% de sacarosa, expuestas a una intensidad de luz de 500-1000 lux, y a una temperatura de  $27 \pm 2$  °C. Los autores informaron el desarrollo de plántulas de *Griffitella hookeriana* de 65 a 70 días de edad. Posteriormente, Seghal *et al.* (1993) lograron el desarrollo de *Polypleurum stylosum* (Podostemaceae), utilizando la técnica de germinación *in vitro*, durante su investigación desarrollaron una técnica de transplantes



sucesivos en medios MS en diferentes condiciones físico-químicas con el fin de inducir morfogénesis, floración y fructificación. Los resultados de su investigación fueron positivos, debido a que obtuvieron la floración y fructificación de esta especie.

#### Estudios en semillas de podostemáceas

Philbrick & Novelo (1994) realizaron el primer estudio comparativo sobre la biología de las semillas de podostemáceas. El objetivo principal de dicho trabajo fue el conocer los requerimientos para la germinación y el tiempo de viabilidad de las especies estudiadas. Los datos que ellos obtuvieron en el laboratorio fueron los siguientes:

*Marathrum rubrum*. Semillas probablemente ortodoxas, con un 100% de germinación después de 18 meses de almacenamiento a 22 °C.

*Oserya coulteriana*. Semillas no recalcitrantes, con un 97% de germinación después de 6 meses de almacenamiento a 22 °C.

*Vanroyenella plumosa*. Semillas probablemente ortodoxas, con un 100% de germinación después de 18 meses de almacenamiento a 22 °C.

*Tristicha trifaria*. Semillas probablemente ortodoxas, con un 97-100% de germinación después de 18 meses de almacenamiento a 22 °C.

En el tabla 3 se mencionan algunas de las características de las semillas de podostemáceas que crecen en México.

Tabla 3. Algunas características de las semillas de podostemáceas que crecen en México. <sup>1</sup>

Especie	No. de semillas por fruto	Ancho de la semilla* (μ)	Longitud de la semilla* (μ)	Porcentaje (%) de germinación (al noveno día)
<b>Subfamilia Podostemoideae</b>				
<i>Marathrum schiedeanum</i> (A)	361(95)	199	320	•
<i>Marathrum rubrum</i> (A)	671(29)	181	321	100
<i>Marathrum tenue</i> (P?)	389(22)	160	264	•
<i>Oserya coulteriana</i> (P)	30(35)	178	303	97
<i>Oserya longifolia</i> (P)	36(15)	166	292	•
<i>Podostemum ricciiforme</i> (P)	<1(50)	173	255	•
<i>Vanroyenella plumosa</i> (A)	333(38)	162	246	97
<b>Subfamilia Tristichoideae</b>				
<i>Tristicha trifaria</i> (P)	30(64)	177	282	100

Datos tomados de Philbrick y Novelo (1994), Philbrick y Novelo (1997). \*semilla madura seca. A=anual, P=perenne; (tamaño de muestra); • sin datos.

## OBJETIVOS

### I. Objetivo general

Realizar estudios citogenéticos de los géneros mexicanos de la familia Podostemaceae en México; que apoyen el entendimiento de sus relaciones filogenéticas.

### II. Objetivos particulares

1. Establecer la metodología más adecuada para los estudios cromosómicos en podostemáceas.
2. Obtener los números cromosómicos somáticos ( $2n$ ) y/o gaméticos ( $n$ ) de las especies de cuatro géneros de la familia Podostemaceae: *Oserya* con 2 especies, (*O. coulteriana* y *O. longifolia*) y los géneros monotípicos *Podostemum*, *Tristicha* y *Vanroyenella*.
3. Elaborar los cariotipos de cada una de las especies de los géneros estudiados, para establecer similitudes intergéricas.
4. Determinar el contenido de ADN nuclear (pg) por citometría de flujo, en las siguientes especies: *Marathrum rubrum*, *Oserya coulteriana* y *Oserya* sp. nov.
5. Realizar el análisis cariotípico de las especies en estudio para tratar de determinar la causa de la variación de los cariotipos y de su contenido de ADN.
6. Proporcionar información citogenética con el fin de integrarla a los estudios sistemáticos y filogenéticos en la familia Podostemaceae.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### I. Trabajo de campo.

En este estudio se incluyeron 16 poblaciones de las especies *Oserya coulteriana*, de los estados de Guerrero y Jalisco; *Podostemum ricciiforme*, de los estados de Oaxaca y Tabasco; *Tristicha trifaria*, de los estados de Jalisco, Oaxaca y Tabasco; y *Vanroyenella plumosa*, endémica a México para los estados de Jalisco y Oaxaca (Tabla 4, Figura 1).

#### Selección de especies y poblaciones

Debido a que el crecimiento vegetativo y la fructificación de las podostemáceas son eventos que ocurren de manera separada durante el año, los cuales dependen del nivel del agua de los ríos y por lo tanto se deben a cambios estacionales, fue necesario visitar las mismas localidades por lo menos dos veces al año, con el fin de obtener muestras adecuadas para los estudios mitóticos y meióticos. También cabe señalar que en las localidades donde se colectaron las diferentes poblaciones, hábitan de 1 a 3 géneros diferentes y para la selección de muestras se contó con el apoyo personal del Dr. Novelo, quién realizó la determinación taxonómica de las especies colectadas.

#### Muestreo

Para el análisis de cromosomas mitóticos; con el fin de obtener semillas maduras de cada población se colectaron los frutos, se colocaron en 'bolsas de papel, se etiquetaron y se almacenaron a una temperatura de  $30 \pm 1$  °C durante un mes para que alcanzaran su completa madurez. De los individuos en etapa de crecimiento (expansión sobre la superficie de la roca) se colectaron raíces de 1-3 cm de longitud, las cuales se pretrataron en ese momento con 8-hidroxiquinoleína 0.002 M por 5 horas y se mantuvieron en la oscuridad, posteriormente se realizaron 3 enjuagues con agua destilada, enseguida se fijaron con Farmer (alcohol absoluto y ácido acético 3:1 v/v).

Para el análisis de cromosomas meióticos; los botones florales se fijaron en solución Farmer, posteriormente se colocaron en alcohol al 70%, la fijación del material se realizó a partir de las 6:00 am hasta las 12:30 pm, lapsos de 15-30 min, y a profundidades de hasta 15 cm.

Para los análisis del contenido de ADN, las hojas jóvenes de diferentes especies fueron colocadas en tubos Eppendorf (1.5 ml), se etiquetaron y se colocaron en hielo seco con el fin de preservarlas hasta el momento de ser procesadas en el laboratorio. También se seleccionaron muestras de hojas jóvenes que se colocaron en bolsas de plástico conteniendo agua del río, se enfriaron a una temperatura aproximada de 2 a 4°C en una hielera, y se transportaron al laboratorio, donde se matuvieron en un acuario con luz y temperatura controlada.

Los ejemplares de referencia de este estudio se depositaron en el Herbario Nacional (MEXU), los datos de colecta se resumen en el tabla 4.

Tabla 4. Datos de colecta de las 16 poblaciones de seis especies de Podostemaceae examinados en este estudio.

Especie	Colectores y números de colecta	Estado y localidad
<i>Marathrum rubrum</i>	Novelo 2429, Ramos y Oropeza	Jalisco: Río Horcones
<i>Oserya coulteriana</i>	Novelo 1449, Ramos, Ratishauser, Oropeza y Murguía.	Guerrero: Río del Oro
	Novelo 1826, Ramos, Oropeza, Murguía y García	Jalisco: Río Horcones
	Novelo 1830, Ramos, Oropeza, Murguía y García	Jalisco: Río Las Juntas
	Novelo 1994, R.A.	Jalisco: Río Horcones
	Novelo 2430, Ramos y Oropeza	Jalisco: Río Horcones
<i>Oserya sp. nov.</i>	Novelo 3628 y Ramos	Tamaulipas: Río San Felipe
<i>Podostemum ricciiforme</i>	Novelo 1833 y Ramos	Oaxaca: Río Usila
	Novelo 2060 y Ramos	Tabasco: Río Pedregal
<i>Tristicha trifaria</i>	Novelo 1823, Ramos, Oropeza y Murguía	Oaxaca: Río El Casquito
	Novelo 1827, Ramos, Oropeza, Murguía y García	Jalisco: Río Horcones
	Novelo 1835 y Ramos	Oaxaca: Río Usila
	Novelo 2062 y Ramos	Tabasco: Río Pedregal
<i>Vanroyenella plumosa</i>	Novelo 1392, Philbrick, Crow y Oropeza	Oaxaca: Río El Casquito
	Novelo 1821, Ramos, Oropeza y Murguía	Oaxaca: Río El Casquito
	Novelo 1828, Ramos, Oropeza, Murguía y García	Jalisco: Río Horcones

Los datos de las etiquetas completas se encuentran citados en el Apéndice.

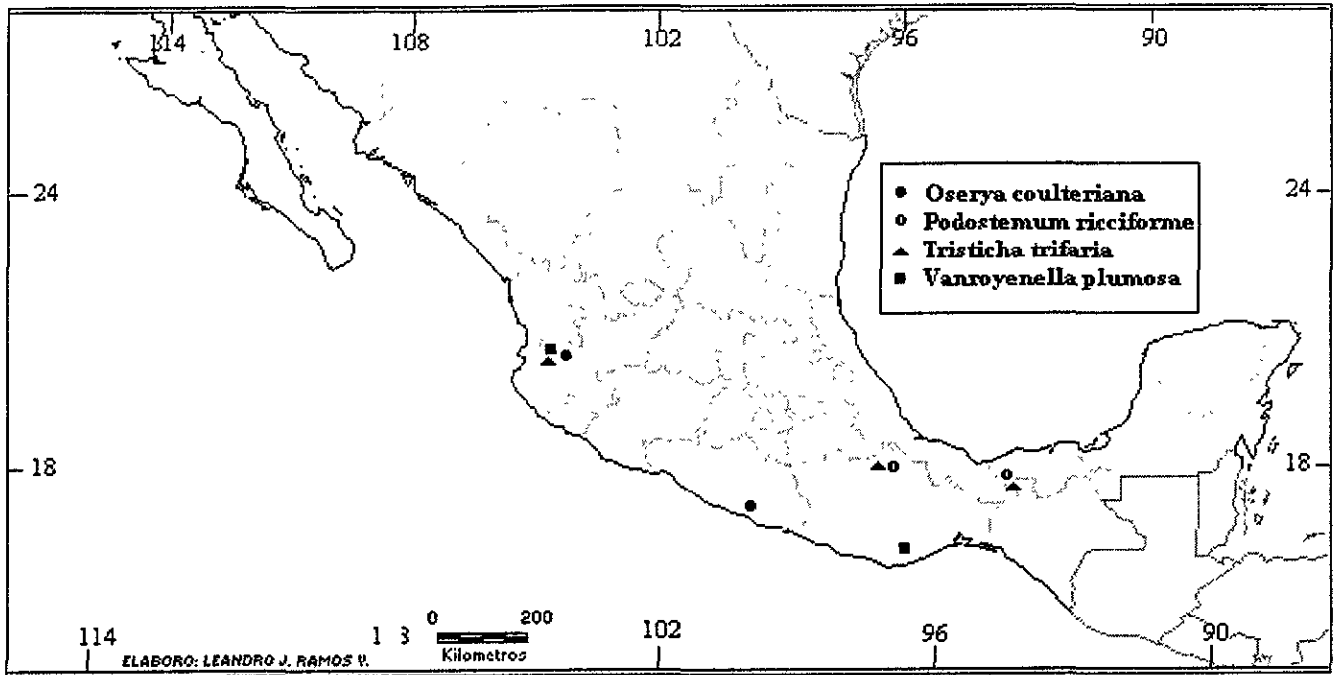


Figura 1. Localización de las poblaciones de Podostemaceae utilizadas en este estudio.

## II. Trabajo de laboratorio.

### Germinación de las semillas

Las semillas de frutos maduros fueron colocadas en un portaobjetos con una gota de agua, con el fin de hidratar la testa. Las semillas se fijaron al vidrio por medio del mucílago que secretan las células de la testa al contacto con el agua y se dejaron secar por una hora. Para su germinación se utilizaron cajas de Petri y un acuario.

Se realizaron pruebas de germinación con lotes de 50 semillas cada uno, de la siguiente manera: se colocaron los portaobjetos con las semillas fijadas a ellos en cajas de Petri que contenían una capa de algodón y papel filtro, sumergidas en agua de la llave esterilizada, posteriormente las cajas fueron colocadas en un cuarto de germinación con un fotoperíodo de 24 h y a temperatura de  $25 \pm 2^\circ\text{C}$ . Para determinar el porcentaje de germinación y el tamaño adecuado de las plántulas, se revisaron periódicamente utilizando un microscopio de disección.

Para simular las condiciones que presentan en la naturaleza y buscando lograr mejores resultados, se utilizó la metodología propuesta por Philbrick & Novelo (1994) y que consiste en lo siguiente: se acondicionó un acuario de 30x16x18 cm, utilizando agua de la llave, con aireación constante utilizando una bomba de dos salidas (2500 cc/minx2), y un sistema de filtrado continuo con filtros de carbón activado y a través de arena fina, a una temperatura de  $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$  y un fotoperíodo de 12 h de luz proporcionada por una lámpara (luz blanca de 50watts). El cloro que contiene el agua de la llave se eliminó con anticloro y como nutrimentos se utilizó un fertilizante para plantas acuáticas con oligoelementos, minerales y hierro (1:4). Posteriormente se colocaron los portaobjetos con las semillas fijadas a ellos a una profundidad de 3 cm.

### Pretratamiento

Para esta parte del estudio se probaron dos técnicas. La primera consistió en el pretratamiento con 8-hidroxiquinoleína 0.002 M de plántulas de 14 días de edad obtenidas mediante la germinación de semillas en acuario y la segunda consistió en utilizar meristemos de raíces y brotes de plantas jóvenes de las diferentes especies pretratadas y fijadas en el campo durante la colecta y que fueron trasladadas al laboratorio para su procesamiento.

### Cromosomas mitóticos

Las raíces o plántulas pretratadas y fijadas en solución Farmer (alcohol absoluto y ácido acético, 3:1 v/v), fueron lavadas con agua destilada, se hidrolizaron con HCl 1N a  $60^{\circ}\text{C}$  por 12 a 15 minutos y después se colocaron en solución Feulgen preparada de acuerdo con García (1990) durante dos horas a  $25^{\circ}\text{C} \pm 1$  y mantenidas en la oscuridad. Con ayuda del microscopio de disección se separó la zona del meristemo apical del resto del tejido y se colocó en un portaobjetos limpio, al cual se le agregó una gota de aceto-orceína al 1%, se le puso el cubreobjetos y posteriormente se realizó un suave aplastamiento con el fin de separar bien las células y revisarlas al microscopio.

Las preparaciones con células completas, cromosomas bien separados y de forma nítida, se congelaron en hielo seco de acuerdo con el método de Conger & Fairchild (1953). Con el fin de

hacer las preparaciones permanentes, se colocaron en una gota de bálsamo de Canadá y un cubreobjetos, se dejaron secar en un horno a 30 °C durante 2 semanas.

Las preparaciones fueron revisadas y los mejores campos se fotografiaron con un fotomicroscopio Zeiss II implementado con una cámara. De cada especie se realizaron los conteos cromosómicos de 1 a 5 células.

### Elaboración de cariotipos

Parámetros de análisis. De cada población, se seleccionaron las mejores fotografías. Para la elaboración del cariotipo, se midieron en cada uno de los cromosomas los siguientes parámetros: longitud del brazo corto (p), longitud del brazo largo (q) y longitud total (p+q). Los cromosomas se ordenaron de acuerdo a la clasificación de Levan *et al.* (1964). El análisis se realizó tomando en cuenta la media ( $\bar{x}$ ) y la desviación estándar (D.E.) de la longitud total de los brazos cortos y los brazos largos de cada par de homólogos del genoma de las poblaciones analizadas.

Se obtuvo el índice centromérico (IC), para la clasificación de los cromosomas, utilizando la siguiente fórmula:

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

Para conocer el grado de asimetría de los cariotipos, se determinaron los índices TF% y F% de acuerdo a Sinha y Roy (1979), utilizando la siguiente fórmula:

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

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

La longitud total de los cromosomas del complemento = LTC, que es la suma de la longitud de todos los cromosomas del genoma, se obtuvo de acuerdo con la siguiente fórmula:

$$LTC = \frac{\Sigma \text{ Longitud total de los cromosomas}}{\text{Número de células analizadas}}$$

### Cromosomas meióticos

Para el análisis cromosómico en etapa de meiosis de las diferentes especies, se utilizó material fijado en Farmer (alcohol absoluto y ácido acético, 3:1) y FAA en el momento de la colecta.

Del material fijado, con ayuda del microscopio de disección, se separaron de la planta botones de diferente tamaño y se colocaron en una caja Petri, los botones se agruparon por tamaño y se seleccionaron los más pequeños de los cuales se separaron las anteras y colocaron en un portaobjetos, rompiendo el tejido para permitir la salida de las células. Se agregó una gota de acetocarmín al 1%, se maceró el tejido para separar las células, se calentó ligeramente el portaobjetos para lograr una mejor tinción de la cromatina. Enseguida se colocó una gota de solución Hoyer's, se mezcló y se calentó nuevamente, se colocó el cubreobjetos y se observó al microscopio de luz.

Las preparaciones en las que se localizaron células madre del polen (CMP) con cromosomas bien separados y en un sólo plano, se dejaron secar de 1 a 2 semanas, en caso necesario se aplicó una ligera presión para separar más los cromosomas.

### Germinación *in vitro* para la medición de ADN

#### Material vegetal

Para llevar a cabo este estudio, se utilizaron solamente semillas maduras de *Vanroyenella plumosa* Novelo 1392, Philbrick, Crow y Oropeza. 10 de Dic. 1994.

#### Desinfección

Las cápsulas se sumergieron en una solución de Kaptan (fungicida) a una concentración de 3 mg/l por 3 a 5 minutos, se lavaron en agua destilada por 3 minutos en agitación constante y se sumergieron en alcohol al 70% durante 30 segundos. Después se pusieron en una



solución de hipoclorito de calcio al 1% con unas gotas de Tween 80 durante 15 a 20 minutos se agitaron con un agitador magnético. Por último, se pasaron a una solución de hipoclorito de sodio al 2%, con unas gotas de Tween 80, durante 20 minutos en agitación constante. Posteriormente, en cámara de flujo laminar, el material se enjuagó 2 veces con agua destilada estéril para eliminar los residuos de la solución desinfectante.

#### Medio de cultivo

El medio de cultivo que se utilizó es el de Murashige & Skoog (MS) de 1962, suplementado con kinetina y sacarosa. Este es el medio de cultivo ampliamente utilizado y que mejores resultados ha dado para un gran número de plantas. Está compuesto básicamente de macroelementos, microelementos, una fuente de carbono, vitaminas y reguladores de crecimiento, así como de un medio de soporte, (Tabla 5).

#### Preparación del medio de cultivo de Murashige y Skoog (1962)

Se utilizó solución madre MS estándar (SIGMA), se preparó de acuerdo a Sehgal *et al.* (1993) a una concentración de 1/20, a un pH de 7. Posteriormente se decantaron 20 ml de medio en frascos de vidrio limpios, se colocaron en 4 de estos frascos cubos de unicel de 2x2 cm y se sellaron los frascos. También se utilizaron matraces Erlenmeyer de 250 ml y tubos de cultivo de 50 ml para el transplante de las plántulas, el medio de cultivo se solidificó con agar al 8%.

#### Esterilización

Los recipientes con medio de cultivo se esterilizaron en un autoclave a una presión de 1.5 kg por cm<sup>2</sup> por 20 minutos. Posteriormente el medio de cultivo se dejó enfriar y reposar por 3 a 4 días.

#### Siembra

En campana de flujo laminar se pusieron los frutos esterilizados en una caja Petri estéril. En cajas de Petri se colocaron portaobjetos, rocas laminadas y los cubos de unicel, sobre estos soportes se vertieron las semillas y se les agregó una gota de agua estéril, se dispersaron sobre la superficie. Las cajas se cerraron, dejándolas secar por 1 a 2 horas. Posteriormente los soportes con las semillas pegadas se introdujeron a los frascos con el medio de cultivo.

Estos se etiquetaron y se colocaron en una cámara de cultivo rotatoria a un fotoperíodo de 16 horas. Se llevaron los registros por día en una libreta.

### Transplante

Se tomaron alicuotas de 5 a 8 ml de medio líquido con plántulas y se colocaron sobre una superficie de agar al 0.8% contenido en matraces de 250 ml (frascos de vidrio y/o tubos de cultivo). El medio fue remplazado cada semana. En cultivos testigo se utilizó sacarosa al 2% y kinetina  $10^{-5}$  M.

### Condiciones ambientales

Los cultivos se mantuvieron en una cámara de crecimiento a  $25 \pm 1$  °C, a un fotoperíodo de 16 horas de luz, a una intensidad lumínica de 3000 lux.

Tabla 5. Composición de medio Murashige & Skoog (1962).

	mg/l
<b>Macroelementos</b>	
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	1650
KNO <sub>3</sub>	1900
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	370
CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	440
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	170
<b>Microelementos</b>	
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	6.2
MnSO <sub>4</sub> ·4H <sub>2</sub> O	22.3
ZnSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	8.6
KI	0.83
NaMoO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O	0.25
CuSO <sub>4</sub> ·5H <sub>2</sub> O	0.025
<b>Hierro</b>	
FeSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	27.8
AEDTA·2H <sub>2</sub> O	37.3
<b>Vitaminas</b>	
Inositol	100
Acido nicotínico	0.5
Piridoxina	0.5
Tiamina	0.1

### Determinación del tamaño del genoma nuclear por citometría de flujo

La suspensión de núcleos se preparó de acuerdo a Otto (1990) con algunas modificaciones de Dolezel & Göhde (1995). Se utilizaron como plantas de referencia *Lycopersicon esculentum* cultivar “Stupické”  $2C = 1.96$  pg de ADN ó *Zea mays* CE-77 variedad Kukurice,  $2C = 5.43$  pg de ADN (Dolezel *et al.*, 1992). Alternativamente se seleccionaron y pesaron en una balanza analítica hojas jóvenes de la planta acuática de interés y la planta de referencia de la siguiente manera: 1) *Marathrum rubrum* 20 mg - *Lycopersicon esculentum* 12-14 mg; 2) *Oserya coulteriana* 30 mg - *L. esculentum* 30 mg; 3) *Oserya* sp. nov. 200 mg- *L. esculentum* 30 mg; 4) *Oserya* sp. nov. 200 mg - *Zea mays* 60 mg. Las hojas de ambas plantas se picaron finamente al mismo tiempo para liberar los núcleos en una caja Petri con 1 ml de ácido cítrico 0.1 M y Tween 20 al 0.5%. El material se filtró usando un filtro de nylon  $50 \mu\text{m}$  y se incubaron por 10 min, a temperatura ambiente. Los núcleos filtrados se centrifugaron a 1000 rpm durante 3 min, y se resuspendieron en 20  $\mu\text{l}$  de ácido cítrico, Tween 20, donde se incubaron por 10 min. Posteriormente, se realizó la tinción en 1 ml de solución preparada de la siguiente manera; 0.4 M fosfato de sodio dibásico,  $50 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$  de yoduro de propidio (PI) y  $50 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$  de RNAasa.

La intensidad de fluorescencia de los núcleos teñidos fueron analizados usando un citómetro de flujo Partec CA II (Partec GmbH, Münster, Germany) con un promedio de velocidad de 20 a 50 núcleos por segundo. Se analizaron de 10-35,000 núcleos por muestra. Se realizaron los registros para cada muestra de la siguiente manera: se analizaron dos individuos de *Marathrum rubrum-Lycopersicon esculentum*, un individuo de *Oserya coulteriana-L. esculentum*, un individuo de *Oserya* sp. nov.-*L. esculentum* y once individuos de *Oserya* sp. nov.-*Zea mays*. Los histogramas resultantes, área de los picos y los coeficientes de variación (%) fueron calculados usando un programa DPAC (Partec GmbH).

En la tabla 6 se resumen los datos de colecta de las especies analizadas para determinar el contenido de ADN utilizando la técnica de citometría de flujo (CF). Los ejemplares de referencia de este estudio se depositaron en el Herbario Nacional (MEXU).

El tamaño del genoma nuclear en las tres especies analizadas fue calculado de acuerdo a Dolezel (1995) usando las siguientes fórmulas:

$$\text{Contenido 2C ADN de } \textit{Marathrum rubrum} \text{ (pg)} = \frac{\text{Medias del pico } G_1 \text{ de } \textit{Marathrum rubrum}}{\text{Medias del pico } G_1 \text{ de } \textit{Lycopersicon esculentum}} \times 1.96$$

$$\text{Contenido 2C ADN de } \textit{Oserya coulteriana} \text{ (pg)} = \frac{\text{Medias del pico } G_1 \text{ de } \textit{Oserya coulteriana}}{\text{Medias del pico } G_1 \text{ de } \textit{Lycopersicon esculentum}} \times 1.96$$

$$\text{Contenido 2C ADN de } \textit{Oserya sp. nov.} \text{ (pg)} = \frac{\text{Medias del pico } G_1 \text{ de } \textit{Oserya sp. nov.}}{\text{Medias del pico } G_1 \text{ de } \textit{Lycopersicon esculentum}} \times 1.96$$

$$\text{Contenido 2C ADN de } \textit{Oserya sp. nov.} \text{ (pg)} = \frac{\text{Medias del pico } G_1 \text{ de } \textit{Oserya sp. nov.}}{\text{Medias del pico } G_1 \text{ de } \textit{Zea mays}} \times 5.43$$

Tabla 6. Datos de colecta de las especies analizadas para determinar el contenido de ADN utilizando la técnica de citometría de flujo (CF).

Especie	Colectores y No de colecta	Estado y localidad
<i>Marathrum rubrum</i>	Novelo 2429, Ramos y Oropeza	Jalisco: Río Horcones
<i>Oserya coulteriana</i>	Novelo 2430, Ramos y Oropeza	Jalisco: Río Horcones
<i>Oserya sp. nov.</i>	Novelo 3628 y Ramos	Tamaulipas: Río San Felipe

## RESULTADOS

### Germinación de semillas y obtención de meristemas

Los resultados de las pruebas de germinación de semillas en cajas Petri fueron positivos sólo para *Tristicha trifaria* y *Vanroyenella plumosa*. *T. trifaria* presentó un porcentaje de germinación de menos del 10%, las plántulas sobrevivieron hasta el séptimo día. *Vanroyenella plumosa* mostró un porcentaje de germinación mayor al 95%, las plántulas sobrevivieron hasta los 14 días de crecimiento, en las cuales se observó desarrollo del meristemo apical del eje primario (epicótilo). Con estas plántulas, se realizaron preparaciones utilizando la técnica de aplastamiento para la observación de cromosomas metafásicos. Las observaciones de las células meristemáticas utilizando la tinción de Feulgen para cromatina mediante microscopía óptica, revelaron que todas las células se detienen en la interfase de su ciclo de división.

La técnica de germinación de semillas en acuario, fue la más adecuada para la obtención de células meristemáticas en división en plántulas de *Vanroyenella plumosa*. La germinación de las semillas fue mayor al 90% al noveno día, las plántulas se mantuvieron vivas hasta los 18 días de edad. El crecimiento del meristemo apical del eje primario se inicia entre el octavo y el décimo día. Con estas plántulas, se realizaron preparaciones utilizando la técnica de aplastamiento para la observación de cromosomas metafásicos. Las observaciones de las células meristemáticas utilizando la tinción de Feulgen para cromatina mediante microscopía óptica, mostró un porcentaje de mitosis (de menos del 1%), los cromosomas en metafase se presentan en este estudio más adelante.

Para *Oserya coulteriana* y *Tristicha trifaria*, la técnica más adecuada para obtener meristemas activos consistió en coleccionar raíces de 1 a 3 cm de longitud con nuevos vástagos y pretratarlas en el campo en horarios cercanos al medio día. A diferencia de las técnicas mencionadas anteriormente, el porcentaje de células en división fue significativo, de tal forma que permitió la observación de diferentes fases del ciclo celular en las zonas meristemáticas. En *Oserya coulteriana* las células con cromosomas metafásicos (M) fueron observadas solamente en

los horarios de pretratamiento de 12:05 y 12:23 h. Mientras que para *Tristicha trifaria* se observaron cromosomas metafásicos a las 12:05 horas.

### Números cromosómicos

En este estudio se reportan por primera vez los números cromosómicos de tres especies de tres géneros diferentes de la familia Podostemaceae presentes en México; *Oserya coulteriana* y *Vanroyenella plumosa* presentaron  $2n = 28$ , mientras que en *Tristicha trifaria* se observaron células somáticas con  $2n = 20$ , (Tabla 7).

### Morfología de los cromosomas

De las cuatro poblaciones estudiadas de *Oserya coulteriana* (Tabla 4), se obtuvieron resultados sólo para la población de Jalisco (Río Horcones), en la que el número diploide fue  $2n = 28$  (Figura 2a, b) y presentó un cariotipo formado por 13 pares de cromosomas metacéntricos (m) y un par de submetacéntricos (sm).

De las tres poblaciones estudiadas de *Vanroyenella plumosa* (Tabla 4), se obtuvieron resultados sólo para la población de Oaxaca, en donde el número diploide fue  $2n = 28$  (Figura 3a, b) y presentó un cariotipo formado por 13 pares de cromosomas metacéntricos (m) y un par de submetacéntricos (sm).

De acuerdo con la clasificación de los cromosomas de Levan *et al.* (1964) y al comparar las fórmulas cariotípicas de *Oserya coulteriana* con *Vanroyenella plumosa* (subfamilia Podostemoideae), no se observaron diferencias importantes en cuanto a las características morfológicas de los cromosomas, las dos especies presentaron 13 pares de cromosomas metacéntricos y un par de cromosomas submetacéntricos (Tablas 8 y 9). Aunque existe similitud entre las fórmulas cariotípicas de las dos especies, el análisis y comparación de los índices de simetría TF% mostró ciertas diferencias, para *Oserya coulteriana* el valor fue de 45.95 mientras que para *Vanroyenella plumosa* fue de 46.97, lo cual indica que el cariotipo de *V. plumosa* es más simétrico que el de *O. coulteriana* (Tabla 11).

De las cuatro poblaciones estudiadas de *Tristicha trifaria* (Tabla 4), se obtuvieron resultados sólo para la población de Tabasco, en donde el número diploide fue  $2n = 20$  (Figura 4a,

b), presentó un cariotipo formado por 10 pares de cromosomas metacéntricos (m), y un TF% de 48.68 (Tablas 10 y 11).

Con el fin de comparar la información obtenida para cada especie, también se elaboraron los idiogramas con base en los promedios de las medidas obtenidas para cada par de cromosomas homólogos que representan el genomio de la especie en cuestión (Figura 6).

#### Número básico

*Oserya coulteriana* y *Vanroyenella plumosa* de la Subfamilia Podostemoideae presentaron un número básico de  $x = 14$ , mientras que *Tristicha trifaria* de la Subfamilia Tristichoideae presentó un  $x = 10$ .

#### Longitud total de la cromatina

Se observó variación intergenérica en la longitud total de la cromatina (LTC). *Oserya coulteriana* presentó un LTC = 28.013  $\mu\text{m}$ , *Vanroyenella plumosa* presentó un LTC = 16.67  $\mu\text{m}$ , en tanto que *Tristicha trifaria* un LTC = 9.17  $\mu\text{m}$  (Figura 5).

#### Cromosomas meióticos

De un total de seis poblaciones analizadas, sólo se observaron en algunos de los horarios revisados células madres del polen (CMP). En los intervalos de tiempos comprendidos entre las 11:30 a las 12:30 horas se observaron profases tempranas (Paquiteno), muy pocas anafases I (AII), anafases II (AII) y en el mayor de los casos, granos de polen. Sin embargo, en ninguna de las muestras analizadas de cada población se observaron metafases I (MI).

#### Germinación *in vitro*

La germinación de las semillas de *Vanroyenella plumosa* de Oaxaca, inició a los cuatro días de haber sido colocadas en el medio de cultivo MS, se observó el desarrollo de las plántulas diariamente. Los cotiledones crecieron hasta dos veces el tamaño de la semilla, en el polo radical aparecieron los pelos unicelulares que permiten la fijación de la plántula al sustrato, los primordios

foliares surgieron del meristemo apical entre los cotiledones. La germinación fue mayor al 90% después del decimo día. Sin embargo, las plántulas transplantadas al día 15 sólo sobrevivieron hasta el día 22.

#### Determinación del tamaño del genoma nuclear por citometría de flujo (CF)

Debido a que la citometría de flujo es una técnica que no había sido empleada para analizar el tamaño del genoma nuclear en las Podostemaceae, fue necesario realizar ensayos preliminares para adecuar dicha técnica y de esta manera obtener resultados confiables. Los resultados de las pruebas efectuadas con hojas jóvenes en tubos Eppendorf (1.5 ml) y transportadas en hielo seco aprox. a  $-9^{\circ}\text{C}$ , fueron las siguientes:

El tamaño del genoma (2C de ADN en pg) de los individuos analizados de *Marathrum rubrum* de Jalisco fue de 1.01 pg, dicho análisis presentó un CV(%) de 7.075 de un total de 21,725 núcleos cuantificados (Tabla 12; Figura 7).

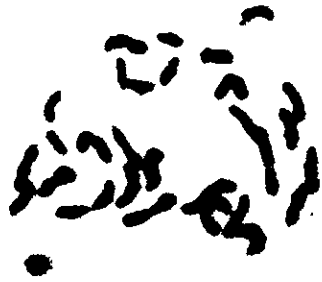
Para *Oserya coulteriana* de Jalisco fue de 2.70 pg de ADN (2C), con un CV (%) de 7.00 de un total de 20,915 núcleos cuantificados (Tabla 12; Figura 8).

*Oserya* sp. nov. de Tamaulipas fue de 2.53 pg de ADN (2C), con CV(%) de 5.30 de un total de 30,309 núcleos cuantificados (Tabla 12; Figura 10).

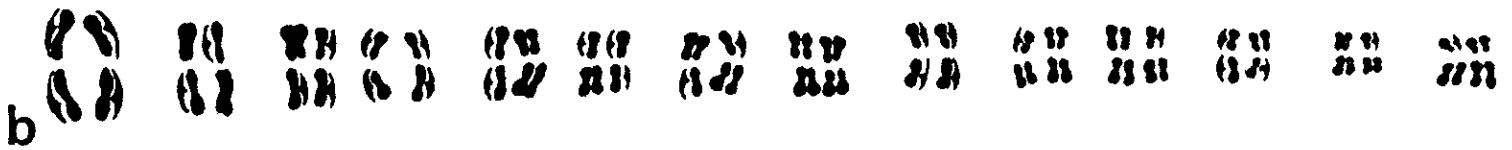
Para las especies anteriores se utilizó como planta de referencia *Lycopersicon esculentum* cv. "Stupické", con 2C = 1.96 pg de ADN.

Para *Oserya* sp. nov. se realizaron 11 lecturas que representaron 11 muestras distintas (Tabla 13) y presentó los siguientes valores promedio: el contenido de 2C de ADN fue de 2.33 pg, con un CV(%) de 5.11, de un total de 293,706 núcleos aislados en suspensión (Tabla 12; Figura 9). En este caso la planta de referencia fue *Zea mays* CE-77 var. "Kukurice", 2C = 5.43 pg de ADN.





a



b



Figura 2. *Oserya coulteriana* de la población de Jalisco. a. Cromosomas en metafase de células somáticas, con  $2n = 28$ . b. Fórmula cariotípica =  $13m + 1 sm$ . Escalas =  $10 \mu m$ .

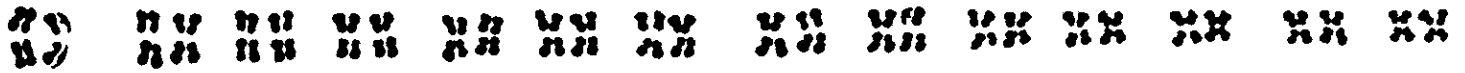


Figura 3. *Vanroyenella plumosa* de la población de Oaxaca. a. Cromosomas en metafase de células somáticas, con  $2n = 28$ . b. Fórmula caiotípica =  $13 m + 1 sm$ . Escalas =  $10 \mu m$ .

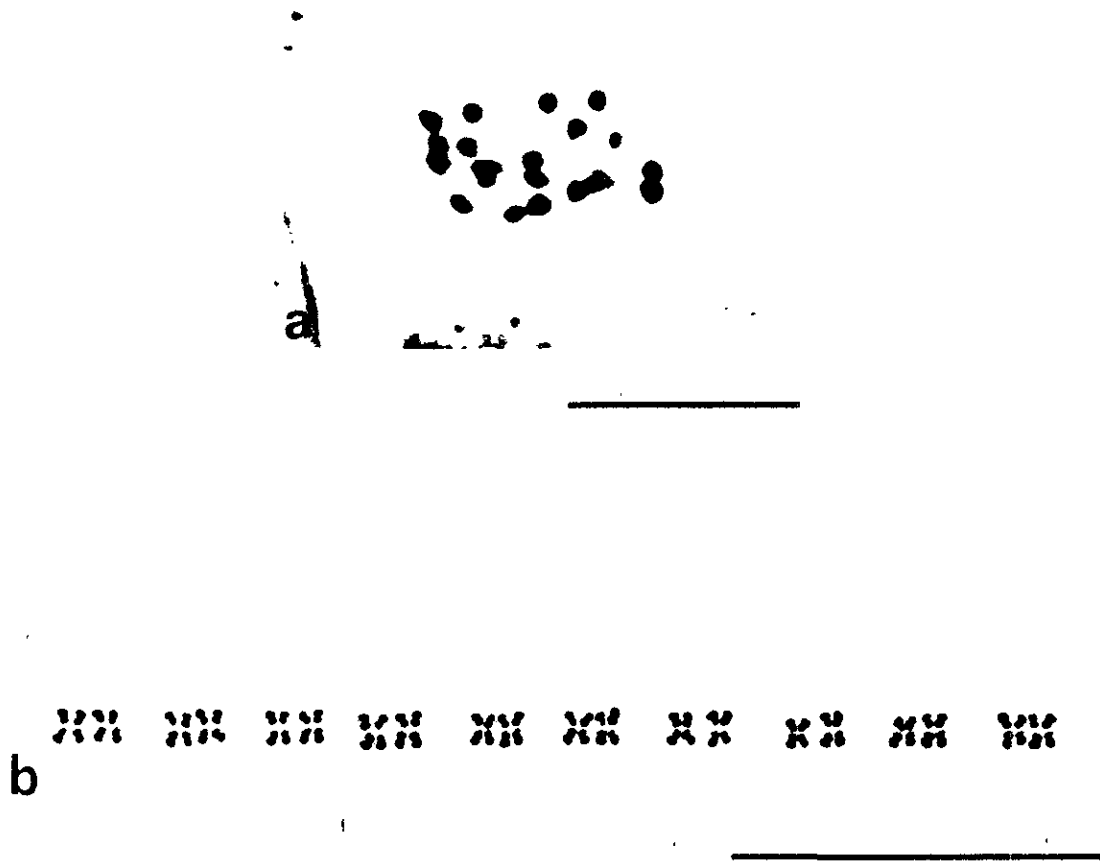


Figura 4. *Tristicha trifaria* de la población de Tabasco. a. Cromosomas en metafase de células somáticas, con  $2n = 20$ . b. Fórmula cariotípica= 10m. Escalas = 10  $\mu$ m.

Tabla 7. Números cromosómicos de tres especies mexicanas de la familia Podostemaceae.

Especie	Colectores y No. de colecta	Estado	2n
<b>Subfamilia Podostemoideae</b>			
<i>Oserya coulteriana</i>	Novelo 1994	Jalisco	28
<i>Vanroyenella plumosa</i>	Novelo 1392	Oaxaca	28
<b>Subfamilia Tristichoideae</b>			
<i>Tristicha trifaria</i>	Novelo 2062	Tabasco	20

Tabla 8. Valores promedio de las características de los cromosomas de *Oserya coulteriana* de la población de Jalisco.

Cromosomas homólogos	Longitud total		Longitud de los brazos largos		Longitud de los brazos cortos		IC	Clase
	x	DE	x	DE	x	DE		
1	3.012	± 0.560	1.635	± 0.247	1.375	± 0.337	45.65	m
2	2.79	± 0.579	1.479	± 0.352	1.311	± 0.232	46.99	m
3	2.337	± 0.414	1.230	± 0.208	1.105	± 0.2.12	47.28	m
4	2.335	± 0.467	1.255	± 0.243	1.079	± 0.264	46.21	m
5	2.255	± 0.428	1.209	± 0.185	1.046	± 0.259	46.38	m
6	2.130	± 0.441	1.119	± 0.230	1.011	± 0.221	47.46	m
7	2.027	± 0.364	1.087	± 0.165	0.940	± 0.206	46.37	m
8	1.947	± 0.432	1.041	± 0.258	0.906	± 0.189	46.53	m
9	1.798	± 0.460	0.953	± 0.250	0.846	± 0.212	47.05	m
10	1.712	± 0.428	0.927	± 0.298	0.785	± 0.228	45.85	m
11	1.572	± 0.400	0.811	± 0.187	0.761	± 0.214	48.41	m
12	1.470	± 0.412	0.777	± 0.229	0.693	± 0.186	47.14	m
13	1.386	± 0.383	0.757	± 0.215	0.629	± 0.171	45.38	m
14	1.772	± 0.286	1.142	± 0.159	0.630	± 0.177	35.55	sm

IC, índice centromérico; m, metacéntrico; sm submetacéntrico; x, media; DE, desviación estándar.

Tabla 9. Valores promedio de las características de los cromosomas de *Vanroyenella plumosa* de la población de Oaxaca.

Cromosomas homólogos	Longitud total		Longitud de los brazos largos		Longitud de los brazos cortos		IC	Clase
	x	DE	x	DE	x	DE		
1	1.61	± 0.03	0.94	± 0.02	0.67	± 0.003	41.61	m
2	1.32	± 0.01	0.68	± 0.04	0.64	± 0.001	48.48	m
3	1.30	± 0.01	0.66	± 0.01	0.64	± 0.001	49.23	m
4	1.29	± 0.01	0.65	± 0.01	0.64	± 0.001	49.61	m
5	1.29	± 0.01	0.65	± 0.01	0.64	± 0.001	49.61	m
6	1.29	± 0.01	0.65	± 0.01	0.64	± 0.001	49.61	m
7	1.29	± 0.01	0.65	± 0.01	0.64	± 0.001	49.61	m
8	1.29	± 0.01	0.65	± 0.01	0.48	± 0.01	49.61	m
9	0.97	± 0.02	0.49	± 0.02	0.48	± 0.01	49.48	m
10	0.97	± 0.02	0.49	± 0.02	0.40	± 0.02	49.48	m
11	0.84	± 0.03	0.44	± 0.02	0.32	± 0.02	47.61	m
12	0.74	± 0.03	0.42	± 0.02	0.32	± 0.02	43.24	m
13	0.66	± 0.04	0.33	± 0.03	0.33	± 0.02	50.00	m
14	1.81	± 0.05	1.14	± 0.03	0.67	± 0.003	37.01	sm

IC, índice centromérico; m, metacéntrico; sm, submetacéntrico; x, media; DE, desviación estándar.

Tabla 10. Valores promedio de las características de los cromosomas de *Tristicha trifaria* de la población de Tabasco.

Cromosomas homólogos	Longitud total		Longitud de los brazos largos		Longitud de los brazos cortos		IC	Clase
	x	DE	x	DE	x	DE		
1	1.303	± 0.326	0.680	± 0.156	0.657	± 0.144	50.00	m
2	1.110	± 0.265	0.557	± 0.135	0.553	± 0.130	49.55	m
3	1.020	± 0.260	0.477	± 0.119	0.503	± 0.125	49.01	m
4	0.950	± 0.226	0.477	± 0.122	0.470	± 0.108	49.47	m
5	0.940	± 0.233	0.433	± 0.094	0.460	± 0.115	48.93	m
6	0.940	± 0.233	0.477	± 0.122	0.460	± 0.115	48.56	m
7	0.877	± 0.170	0.433	± 0.094	0.397	± 0.060	50.00	m
8	0.803	± 0.133	0.407	± 0.066	0.380	± 0.053	49.35	m
9	0.773	± 0.121	0.393	± 0.068	0.363	± 0.025	48.65	m
10	0.657	± 0.015	0.333	± 0.015	0.320	± 0.010	48.48	m

IC, índice centromérico; m, metacéntrico; x, media; DE, desviación estándar.

## LONGITUD TOTAL DE LA CROMATINA

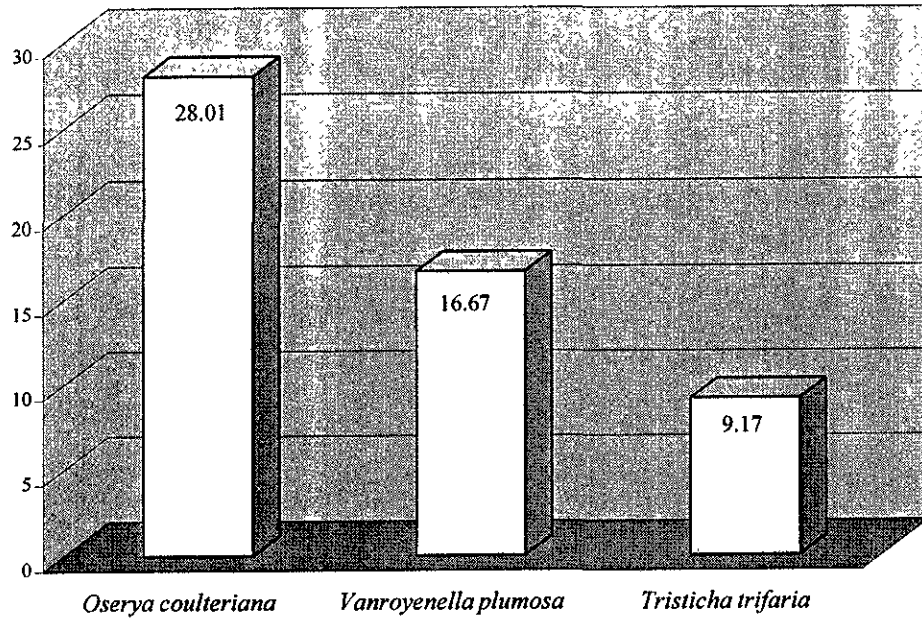


Figura 5. Cantidad total de cromatina de tres especies de podostemáceas mexicanas. El valor de cada barra representa la longitud total de la cromatina (LTC), expresada en micras ( $\mu\text{m}$ ).

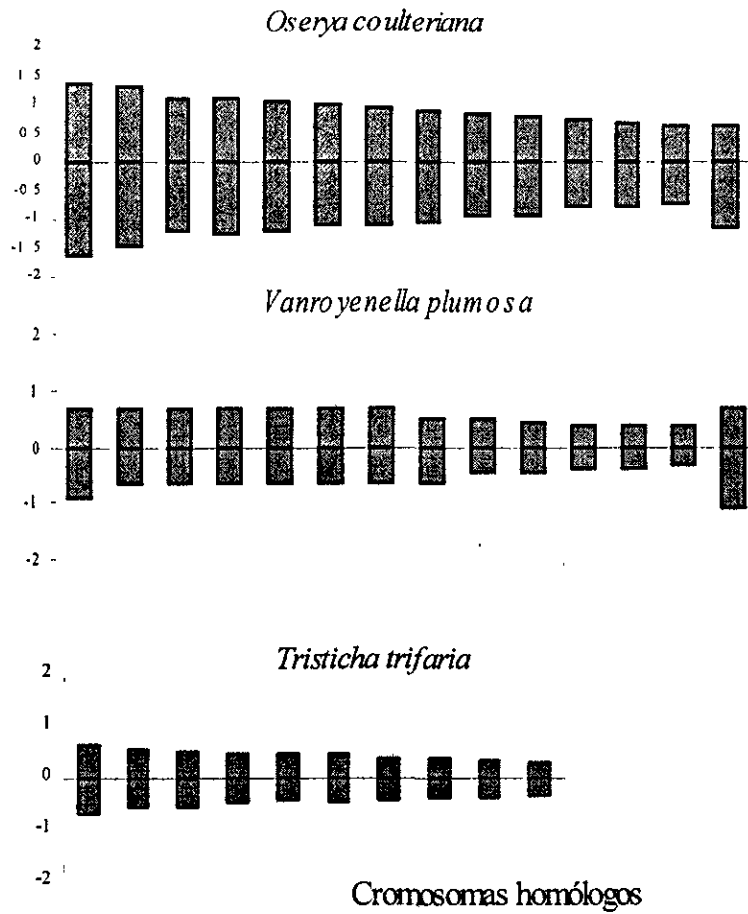


Figura 6. Idiogramas. **a.** *Oserya coulteriana*, con fórmula cariotípica formada de 13m+1sm. **b.** *Vanroyenella plumosa* con fórmula cariotípica formada de 13m+1sm. **c.** *Tristicha trifaria* con 10 cromosomas metacéntricos. La línea media indica la posición del centrómero en cada uno de los pares de cromosomas. Valores de LTC en  $\mu\text{m}$ .



Tabla 11. Cariotipo de tres especies de la familia Podostemaceae.

Espece	2n	Fórmula cariotípica	Longitud total de los cromosomas ( $\mu$ )	Intervalo de la longitud cromosomas ( $\mu$ )	Promedio de la longitud de los cromosomas ( $\mu$ )	Intervalo de F%	TF%	n f
<b>Subfamilia Podostemoideae</b>								
<i>Oserya coulteriana</i>	28	13m+1sm	28.013	1.38 - 3.01	2.04	35.55 – 48.41	45.95	28
<i>Vanroyenellaplumosa</i>	28	13m+1sm	16.67	0.66 - 1.81	1.19	37.01 – 50.00	46.97	28
<b>Subfamilia Tristichoideae</b>								
<i>Tristicha trifaria</i>	20	10m	9.17	0.65 - 1.30	0.64	45.26 – 50.00	48.68	20

n f = número fundamental; TF% y F% = índices de asimetría.

Tabla 12. Datos del tamaño del genoma nuclear por CF de tres especies de podostemáceas.

Especie	x	ADN (pg)	CV %	No. de individuos	No. de núcleos	Planta de referencia
	A. <i>Marathrum rubrum</i>	53	1.02	7.07	2	21,725
B. <i>Oserya coulteriana</i>	50	2.70	7.00	1	20,915	1
C. <i>Oserya</i> sp. nov.	66	2.53	5.30	1	30,309	1
D. <i>Oserya</i> sp. nov.	43	2.33	5.11	11	293,706	2

A, B y C: análisis preliminar de ADN; D: cantidad de ADN de *Oserya* sp. nov.; 1 = *Lycopersicon esculentum*; 2 = *Zea mays*; CV% = coeficiente de variación

Tabla 13. Contenido de ADN nuclear (pg) de *Oserya* sp. nov., utilizando *Zea mays* como planta de referencia.

No. de lecturas	CV(%)		x de picos G <sub>1</sub> (2C)		Radio	No. de núcleos	ADN (pg)
	<i>Oserya</i>	<i>Zea</i>	<i>Oserya</i>	<i>Zea</i>			
1	5.68	3.50	44	100	0.44	21040	2.39
2	5.68	4.40	44	102	0.43	20697	2.33
3	5.00	3.00	40	100	0.40	10745	2.17
4	5.68	3.92	44	102	0.43	31438	2.33
5	4.65	3.31	43	96	0.45	31442	2.44
6	4.76	3.09	42	97	0.43	31372	2.33
7	5.56	4.37	45	103	0.44	31649	2.39
8	4.55	3.96	44	101	0.43	29077	2.33
9	4.44	3.37	45	104	0.43	35911	2.33
10	5.68	2.97	44	101	0.44	19289	2.39
11	4.55	2.80	44	107	0.41	31046	2.23
Promedio	5.11				0.43	Σ 293706	2.333

Radio = x *Oserya* sp. nov. / x *Zea mays*, (radio de fluorescencia).

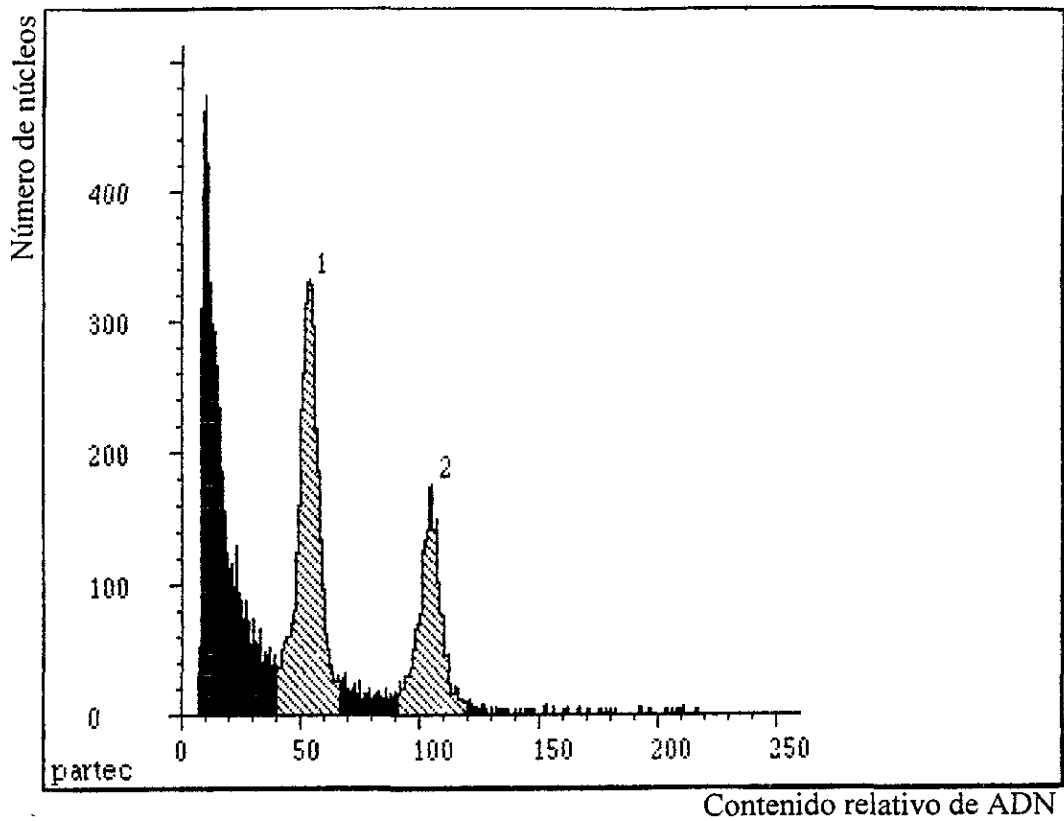


Figura 7. Distribución de contenido de ADN nuclear obtenido del análisis por citometría de flujo de núcleos aislados y teñidos con yoduro de propidio (IP) de hojas jóvenes de *Maratrum rubrum* (Jalisco). El pico 1 representa núcleos G<sub>1</sub> con 2C de ADN = 1.01 pg de *M. rubrum*. El pico 2 representa los núcleos G<sub>1</sub> de *Lycopersicon esculentum* aislados simultáneamente que sirvieron de planta de referencia.

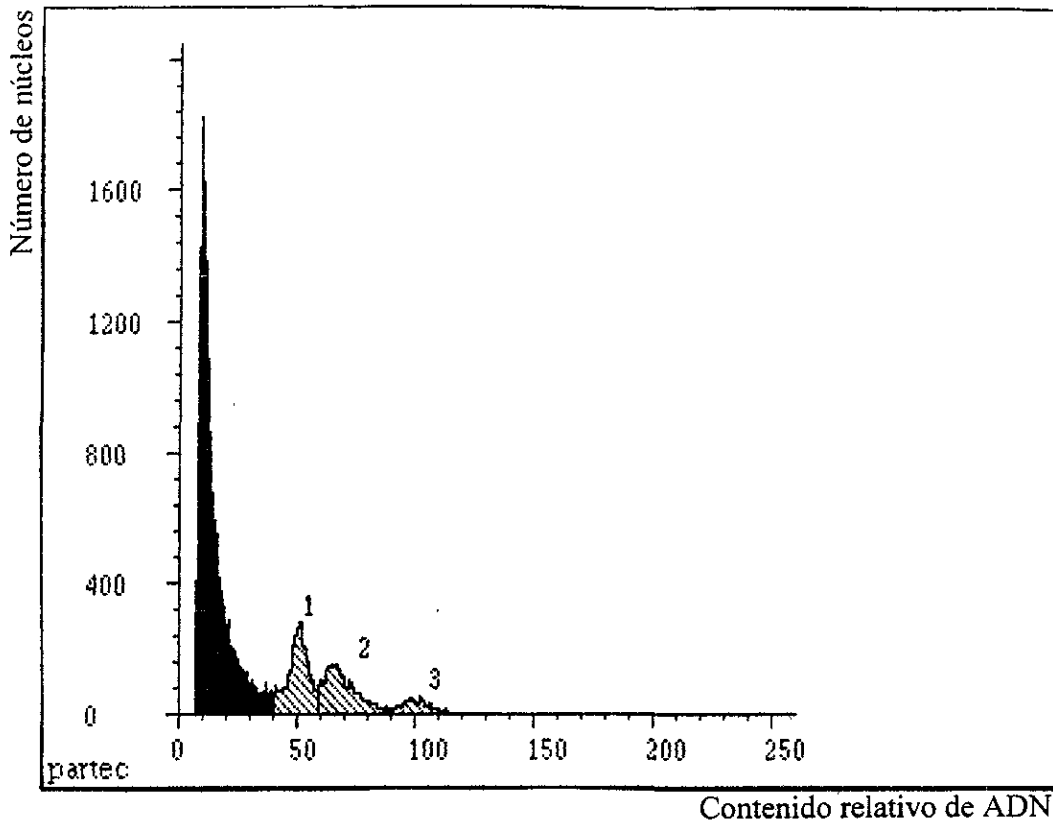


Figura 8. Distribución del contenido de ADN obtenido del análisis por citometría de flujo de núcleos aislados y teñidos con ioduro de propidio (IP) de hojas jóvenes de *Oserya coulteriana* (Jalisco). Los picos 1 y 3 representan núcleos  $G_1$  (2C) y  $G_2$  (4C) de *Lycopersicon esculentum*, aislados simultáneamente que sirvieron de planta de referencia. El pico 2 representa los núcleos  $G_1$  (2C) de *O. coulteriana* con  $2C = 2.70$  pg de ADN.

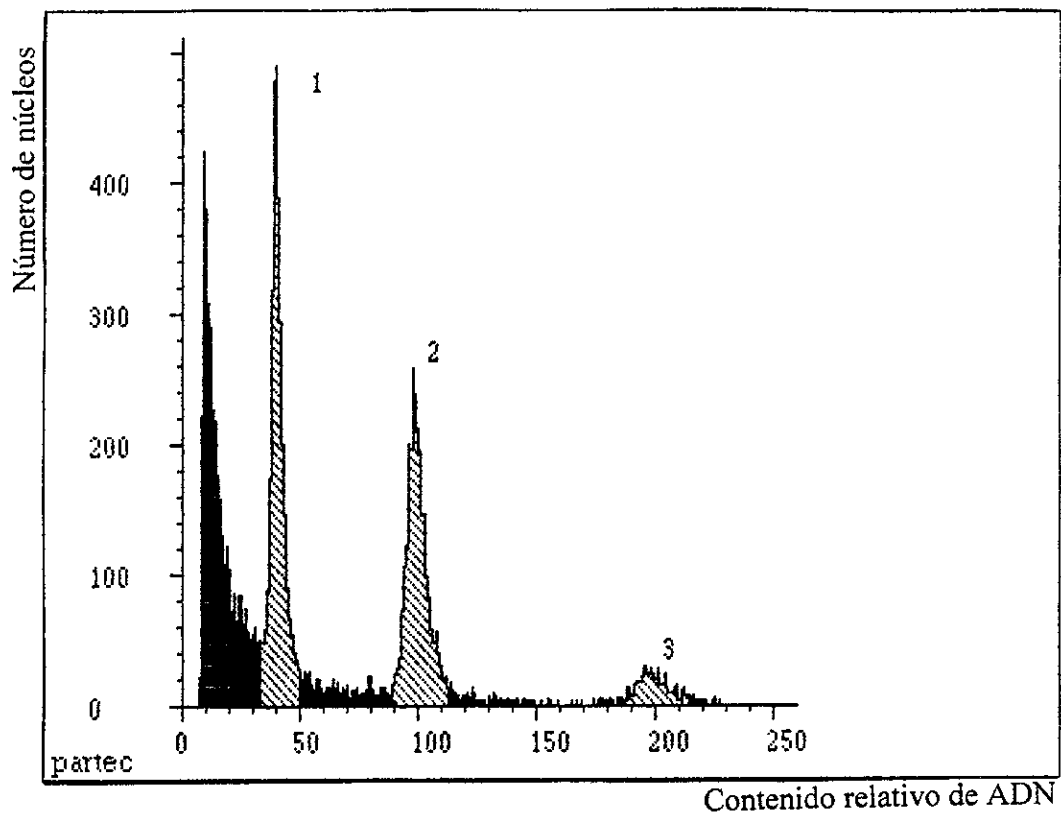


Figura 9. Distribución del contenido de ADN obtenido del análisis por citometría de flujo de núcleos aislados y teñidos con yoduro de propidio (IP) de hojas jóvenes de *Oserya* sp. nov. (Tamaulipas). El pico 1 representa núcleos  $G_1$  (2C) de *Oserya* sp. nov. con  $2C = 2.33$  pg de ADN. Los picos 2 y 3 representan núcleos  $G_1$  (2C) y  $G_2$  (4C) de *Zea mays* aislados simultáneamente que sirvieron de planta de referencia.

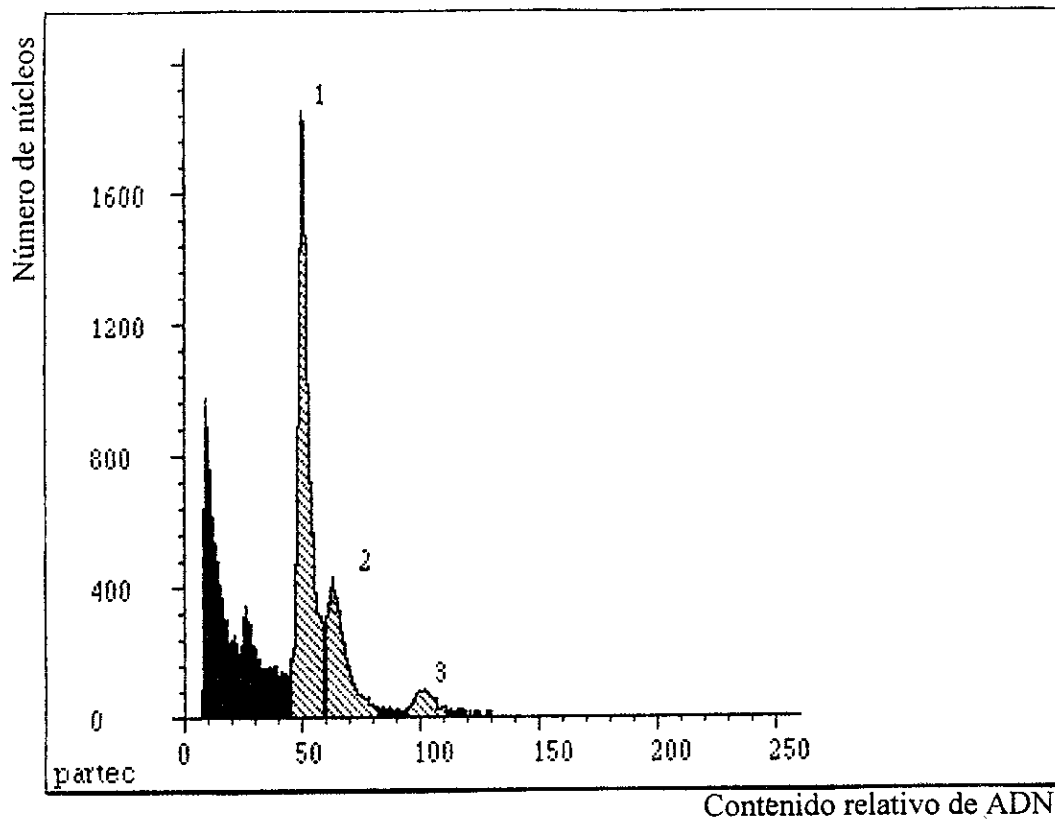


Figura 10. Distribución del contenido de ADN obtenido del análisis por citometría de flujo de núcleos aislados y teñidos con ioduro de propidio (IP) de hojas jóvenes de *Oserya* sp. nov. (Tamaulipas). Los picos 1 y 3 representan núcleos  $G_1$  (2C) y  $G_2$  (4C) de *Lycopersicon esculentum* aislados simultáneamente que sirvieron de planta de referencia. El pico 2 representa los núcleos  $G_1$  (2C) de *Oserya* sp. nov. con  $2C = 2.53$  pg de ADN.

## DISCUSIÓN

### Técnicas para los estudios citogenéticos en podostemáceas

La morfología peculiar de las podostemáceas es uno de los factores que limitan los estudios citogenéticos en este grupo de plantas, debido principalmente a que crecen enraizadas sobre la superficie de las rocas que se encuentran sumergidas en el agua. Estas plantas presentan importantes modificaciones estructurales en las raíces, ya que su función es principalmente de anclaje. Esto se puede observar a los pocos días (4 a 5) después de haberse iniciado la germinación, lo cual coincide con la descripción que realizó Philbrick (1984). Después de hidratarse la semilla, el hipocótilo rompe la testa al cuarto día, es de color verde y posiblemente fotosintético, surge en el mismo plano del eje longitudinal de la semilla y posteriormente se dobla hacia abajo. Del ápice de la radícula se originan elongaciones de la pared celular de células epidérmicas, que van a servir de mecanismo de unión al sustrato, adhiriéndose a él por secreción de una sustancia adhesiva. Del ápice del hipocótilo, entre los cotiledones, surge el meristemo apical del eje primario (epicótilo).

La germinación ocurrió solamente en *Tristicha trifaria* y *Vanroyenella plumosa*, en la primera especie la sobrevivencia fue muy baja, mientras que en *Podostemum ricciiforme* y *Oserya coulteriana* no hubo germinación, posiblemente esto se deba a los requerimientos en un microhábitat muy específico.

Aunque la germinación en *Vanroyenella plumosa* es mayor del 90% al noveno día, las condiciones en acuario con fotoperíodo de 12 horas y temperatura controlada, al parecer no fueron las adecuadas para su crecimiento. El análisis demostró que las células meristemáticas se detienen en la interfase. Este comportamiento en el ciclo de división de las células puede ser causado por diversos factores específicos tales como, cierta concentración de gases y minerales en el agua o la velocidad de corriente, entre otros.

En este estudio se encontró que una de las técnicas más adecuadas para obtener meristemas activos, consistió en pretratar el material juvenil al momento de ser colectado

utilizando un mitostático adecuado, en horarios cercanos al medio día, ya que de acuerdo a Ruthishauser *et al.* (1999) las raíces jóvenes son verdes y fotosintéticas.

### Números cromosómicos y números básicos en las Podostemaceae

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

En la figura 11 se muestran los números cromosómicos y los cariotipos obtenidos hasta el momento para 12 géneros y 14 especies de la familia Podostemaceae (Tabla 2), incluyendo los obtenidos en este trabajo (Tabla 7) y con esta información se proponen las tendencias evolutivas para los dos grupos divergentes que corresponden a las subfamilias Podostemoideae y Tristichoideae.

En este estudio dos géneros pertenecientes a la subfamilia Podostemoideae *Oserya* y *Vanroyenella* presentaron  $x = 14$ . Este número básico también fue reportado para tres especies del género *Marathrum* (Oropeza *et al.*, 1998). Por lo tanto, cinco especies de tres géneros de las Podostemoideae que habitan en México presentaron un  $x = 14$  (Tabla 13).

Considerando el número básico  $x = 10$  para las Podostemoideae, los diferentes números básicos (Figura 11) encontrados en varios géneros ( $x = 13, 14, 15$  y  $17$ ) probablemente se originaron mediante aneuploidía básica ascendente en nivel diploide ( $x = 10$ ). Grant (1989) señaló este mecanismo cromosómico en por lo menos 6 géneros de angiospermas (*Cephalaria*, *Clarkia*, *Crocus*, *Fritillaria*, *Narcissus*, *Phacelia*). El aumento aneuploide puede ser causado por una división anormal del centrómero, donde un cromosoma se divide transversalmente y de esta forma un cromosoma metacéntrico o submetacéntrico origina dos cromosomas telocéntricos o subtelocéntricos. Es probable que este mecanismo cromosómico se presentó durante el proceso de especiación de las podostemáceas, debido a que el cariotipo de cuatro géneros asiáticos (*Cladopus*, *Dalzellia*, *Hydrobryopsis* y *Polypleurum*) presentan cromosomas telocéntricos y



subtelocéntricos (Tabla 14). Otro mecanismo de aumento aneuploide es por la incorporación de un par adicional de cromosomas del complemento regular como resultado del retraso durante la división celular. De esta forma se produce un tipo tetrasómico ( $2n + 2$ ). También puede ocurrir por incorporación de tetrasómicos que han experimentado translocaciones.

Sí el número básico para las Podostemoideae es  $x = 10$ , entonces los números básicos observados de  $x = 13, 14, 15$  y  $17$  podrían formar una serie disploide. La serie disploide está bien documentada en otros grupos de plantas, como por ejemplo en las palmas (Palomino y Quero, 1992), las cuales presentan números gaméticos consecutivos en un rango de  $n = 13$  a  $n = 18$ . Los grupos más primitivos o ancestrales, tienen números cromosómicos básicos más altos en la serie disploide. El grupo más primitivo (Subfamilia Coryphoideae) presenta  $n = 18$ , que es el número más alto de la serie disploide, lo cual indica que los números cromosómicos más bajos ( $x = 13$ ) son congruentes con los altos niveles de especialización de grupos y géneros.

De acuerdo con lo anterior, los números actuales encontrados en las podostemáceas son probablemente derivados poliploides de un poliploide ancestral (paleopoliploide). Por lo tanto el número  $4x = 2n = 40$  correspondería a un tetraploide antiguo. Grant (1989) mencionó que la pérdida de uno o más pares de cromosomas en un poliploide, frecuentemente se puede tolerar debido a la presencia de factores duplicados en los cromosomas homólogos u homeólogos (autopoliploide o alopoliploide respectivamente). En caso de alopoliploidía el cambio en el número cromosómico podría originarse por aumento aneuploide (es raro en poblaciones naturales). Un ejemplo de esto se presenta en el grupo *Erophila* (Brassicaceae), cuando se realizó la cruce híbrida de 15 cromosomas más 32 cromosomas, el híbrido  $F_1$  presentó numerosos cromosomas impares. En las generaciones posteriores endógamas se analizaron ocho líneas derivadas estables, con números aneuploides con  $n = 22, 23, 25, 29, 31$  y  $34$ . La aneuploidía también ocurre en poblaciones silvestres de Europa.

Para la única especie de las Tristichoideae presente en México, *Tristicha trifaria*, se encontró un  $2n = 20$ . Para esta subfamilia se han reportado los números cromosómicos de tres especies (3 géneros): el número  $2n = 20$  de *T. trifaria*, coincide con el propuesto para dos especies asiáticas *Indotristicha malayana* y *Dalzellia zeylanica*, aunque para la segunda especie

Uniyal y Mohan Ram (1994) también informaron de un número cromosómico de  $2n = 30$ . Mientras que para la especie americana, *Weddelina squamulosa*, se reportó un  $n = 20$  y  $2n = 40$ . De acuerdo a esta información, el número básico para la subfamilia Tristichoideae es  $x = 10$ . Esto indica que el principal mecanismo de evolución del grupo fue la poliploidía.

En caso de autoploidía, la estabilidad de los tetraploides  $4x = 2n = 40$  ( $x = 10$ ) o tetraploides  $4x = 2n = 20$  ( $x = 5$ ) posiblemente se deba a procesos de diploidización, en éste, los poliploides antiguos tienden a parecerse más a los diploides que a los poliploides recientemente formados. Esta diploidización afecta tanto el comportamiento citológico como la constitución génica de los poliploides (Grant, 1989). Cuando surge un autopoliploide nuevo, es de esperarse que presente una alta frecuencia de multivalentes, lo cual causa la reducción de su fertilidad. Pero la selección natural (o artificial) para la fertilidad favorece a los genes disponibles que promueven la formación de bivalentes en vez de multivalentes. En una línea autotetraploide de maíz (*Zea mays*,  $x = 10$ ), se comparó al principio y al final de un período de 10 años de selección y se encontró en las primeras generaciones un 89% de 8-10 IV en las células madres del polen, mientras que los descendientes presentaron 52% de 8-10 IV. Por lo tanto la frecuencia de bivalentes aumentó cuando la frecuencia de multivalentes disminuyó (Gilles & Randolph, 1951). En un citotipo autotetraploide de *Gibasis schiedeana*, se observó también un alto porcentaje (59.20%) de bivalentes mostrando en este genotipo el efecto de la diploidización (Martínez & Palomino, 1997).

#### Morfología cromosómica y longitud total de la cromatina

El estudio comparativo de los cariotipos en las diferentes especies y géneros pueden dar información sobre los procesos de especiación en un grupo de plantas (Sinha & Roy, 1979; Stebbins, 1971).

Las diferencias en la longitud total de la cromatina entre diferentes especies pueden ser debidas a mutaciones estructurales y al papel de los segmentos heterocromáticos durante el proceso de evolución. Probablemente la selección natural actúe sobre los segmentos de heterocromatina inerte y sean eliminados por deleción produciendo una disminución del tamaño

cromosómico. Al respecto Sinha & Roy (1979) mencionaron que en algunos casos la pérdida de segmentos de heterocromatina puede ser tolerada por las especies.

Stebbins (1971) señaló que una mayor longitud de la cromatina y alto contenido de ADN son características que corresponden a especies primitivas, sin embargo, Sinha & Roy (1979) consideraron que el estado evolutivo de las especies en base a la longitud total de la cromatina no incluye a otros factores que operan durante la especiación y por lo tanto no indica la secuencia evolutiva de las especies.

En los géneros mexicanos pertenecientes a la subfamilia Podostemoideae, el grado de asimetría se correlacionó mediante los valores obtenidos de los índices de asimetría, *Marathrum schiedeanum* presentó un TF% de 42.31 y un intervalo de F% de 33.33 a 45.89, mientras que *M. tenue* presentó un TF% de 45.37 y un intervalo de F% de 41.64 a 48.03. Respecto a las diferencias observadas en los índices de asimetría, un valor de TF% alto, indica un cariotipo más simétrico, en tanto que un intervalo más amplio de F% indica una estructura más asimétrica del cariotipo. De acuerdo con esto, *M. tenue* presentó un cariotipo más simétrico que el resto de las especies de este género (Tabla 14).

En el presente estudio el análisis cariomorfológico mostró que, *Oserya coulteriana* y *Vanroyenella plumosa* presentaron cariotipos similares, ambos formados por 13 pares de cromosomas metacéntricos y un par de submetacéntricos. Sin embargo, el análisis y comparación de los índices de simetría TF% mostró ciertas diferencias. Para *Oserya coulteriana* el valor fue de 45.81 y el intervalo de F% de 35.55 a 48.41, mientras que para *Vanroyenella plumosa* fue de 47.06 y el intervalo de F% de 37.01 a 50.0, lo cual indica que el cariotipo de *V. plumosa* es más simétrico que el de *O. coulteriana*.

Al respecto, Lewitzky (1931) consideró que los cariotipos más simétricos (con mayor número de metacéntricos) son más primitivos, y este parámetro puede ser utilizado para indicar la dirección evolutiva de las especies. Sin embargo, Jones (1978) sugirió que para conocer la dirección evolutiva de los diferentes grupos de plantas es necesario correlacionar la información citogenética con otro tipo de parámetros, debido a que si la tendencia a la asimetría en un grupo ya se ha alcanzado en su totalidad, se dará una tendencia evolutiva hacia una nueva simetría.

Al comparar y analizar los índices de asimetría TF% de los cariotipos de dos especies asiáticas (2 géneros) con los índices de cinco especies (3 géneros) americanas de la subfamilia Podostemoideae (Tabla 14) se observó que los géneros asiáticos presentan cariotipos más asimétricos, con valores de TF% de 28.75 a 38.83, mientras que los géneros americanos tienen cariotipos más simétricos, con TF% de 42.31 a 46.97. Este mismo comportamiento se presenta en los dos géneros de Tristichoideae, uno asiático y otro americano. De acuerdo a esta información y tomando en cuenta la teoría de Lewitzky (1931) sobre la tendencia evolutiva del carácter del grado de simetría del cariotipo, las especies americanas pertenecientes a Podostemoideae y Tristichoideae son más primitivas que las asiáticas.

La longitud total de la cromatina (LTC) en los diferentes géneros y especies de podostemáceas presenta un intervalo entre 9.17  $\mu$  a 105.47  $\mu$  (Tabla 14) y se correlaciona con el número cromosómico somático ( $2n$ ) y el número básico ( $x$ ).

De acuerdo al párrafo anterior, en las podostemáceas la tendencia es al incremento de la longitud total de la cromatina. Esto apoya la idea de que la poliploidía a jugado un papel importante en la evolución de este grupo de plantas. Sin embargo, los diferentes números básico (serie disploide) debidos a cambios aneuploides y la tendencia hacia la asimetría de los cariotipos podrían ser causados por translocaciones desiguales con pérdida de cromatina.

Esta hipótesis es apoyada por los estudios de filogenia en las Podostemaceae en base a estudios de *rbcL* (Figura12).

Tabla 14. Comparación de los cariotipos de especies Asiáticas y Americanas.

Especies	2n	LTC ( $\mu$ )	Intervalo de la longitud de los cromosomas ( $\mu$ )	Promedio de la longitud de los cromosomas ( $\mu$ )	Intervalo de F%	TF%	Fórmula cariotípica
<b>Subfamilia Podostemoideae</b>							
Asiáticas							
<i>Cladopus nymanii</i>	30	*	0.50 - 2.00	*	*	*	8 grandes+7 pequeños
<i>Hydrobryopsis sessilis</i>	26	62.88	1.15 - 4.14	*	*	28.75	3m+6sm+2st+2t
<i>Polypleurum stylosum</i>	34	105.47	0.75 - 6.25	*	*	38.83	6m+7sm+2st+2t
Americanas							
<i>Marathrum rubrum</i>	28	34.50	0.87 - 1.42	1.13	39.28 - 47.41	43.28	14m
<i>M. schiedeanum</i>	28	35.30	1.16 - 1.26	1.26	33.33 - 45.89	42.31	11m+3sm
<i>M. tenue</i>	28	40.61	0.95 - 2.07	1.62	41.64 - 48.03	45.37	14m
<i>Oserya coulteriana</i>	28	28.01	1.38 - 3.01	2.04	35.55 - 48.41	45.95	13m+1sm
<i>Vanroyenella plumosa</i>	28	16.67	0.66 - 1.81	1.19	37.01 - 50.00	46.97	13m+1sm
<b>Subfamilia Tristichoideae</b>							
Asiáticas							
<i>Dalzellia zeylanica</i>	30	72.60	0.90 - 4.45	*	*	35.33	6m+6sm+1st+2t
Americanas							
<i>Tristicha trifaria</i>	20	9.17	0.65 - 1.30	0.64	45.26 - 50.00	48.68	10m

• = sin dato.

### Cromosomas meióticos

Aunque la técnica de colecta de botones florales se realizó para obtener muestras de los diferentes estados de desarrollo, es decir, a diferentes profundidades y en diferentes horarios del día, con el fin de observar los cromosomas meióticos, estos no fueron observados. Al respecto, Murguía *et al.* (en prensa) mencionaron que para *Vanroyenella plumosa*, las estructuras reproductivas están completamente bien formadas, aún cuando los primordios florales se encuentran sumergidos en el agua e inmersos en el tejido materno. En este estudio se observó un patrón similar en otras especies analizadas. Las anteras de los botones florales más pequeños se encontraban inmaduros, mientras que en anteras de botones de mayor tamaño solamente se observó el polen, cuando se observaron anteras con CMP todas se encontraban en interfase o profase I. Por lo que es necesario plantear otra metodología para obtener información sobre los factores que ocasionan la división meiótica de las CMP para su maduración en las podostemáceas.

### Germinación *in vitro*

Los resultados de la germinación de semillas *in vitro* de *Vanroyenella plumosa* en medio líquido de MS ( $1 \times 10^{-5}$ ) suplementado con 0.5% de sacarosa, expuestas a una intensidad de luz de 500-1000 lux, y a una temperatura de  $27 \pm 2$  °C coinciden con los reportados para *Griffitella hookeriana* por Vidyashankari & Mohan Ram (1987). En este estudio se observó desarrollo de las plántulas hasta el día 22. También se trató de utilizar la técnica propuesta por Seghal *et al.*, (1993) de trasplantes sucesivos en medios MS en diferentes condiciones físico-químicas, sin embargo, las plántulas no sobrevivieron al primer trasplante. Con base en las observaciones de laboratorio, es necesario realizar pruebas de trasplantes sucesivos con plántulas de diferentes edades, con el fin de obtener plántulas más vigorosas que resistan los cambios del medio, así como probar medios MS suplementados con concentraciones diferentes de hormonas, con el fin de crear microambientes adecuados para el desarrollo de las plántulas.

### Contenido de ADN nuclear por citometría de flujo (CF)

De acuerdo con los resultados obtenidos del contenido de ADN, las dos especies de podostemáceas mexicanas analizadas en este estudio presentaron genomas pequeños. *Marathrum rubrum* presentó una menor cantidad de ADN nuclear,  $2C = 1.01$  pg, mientras que *Oserya coulteriana*  $2C = 2.70$  pg. Las determinaciones del tamaño del genoma ( $2C$  de ADN pg) en estas dos especies, se consideran preliminares debido a que por falta de material se realizaron únicamente dos repeticiones en *M. rubrum* y una en *O. coulteriana*.

En *Oserya* sp. nov. se realizó un análisis preliminar con *Lycopersicon esculentum* y se comparó con *Oserya coulteriana* (Tabla 12, Figura 10). Posteriormente, para la determinación del tamaño del genoma de *Oserya* sp. nov. se utilizó *Zea mays* como planta de referencia. Los picos  $G_1(2C)$  de *Oserya* sp. nov. y *Zea mays* están individualizados y sus medias presentan una diferencia no mayor al doble de la media de *Oserya* sp. nov. (Tabla 13). Para *Oserya* sp. nov. se determinó el tamaño del genoma  $2C = 2.33$  pg (Tabla 13, Figura 9). Debido a que no se conoce el número cromosómico de esta última especie, se le comparó con *Oserya coulteriana* (Jalisco) con  $2n = 28$  y considerando que los valores del contenido de ADN nuclear de ambas especies son relativamente similares, se puede inferir que *Oserya* sp. nov. sea diploide con un número cromosómico de  $2n = 28$ , sin embargo este dato requiere su confirmación.

### Relaciones filogenéticas en las Podostemaceae

Respecto a las relaciones filogenéticas de este grupo de plantas Les *et. al.* (en preparación), (Figura 12) formularon una hipótesis de radiación tropical múltiple en las Podostemaceae (*sensu lato*). Ellos construyeron árboles filogenéticos a partir de secuencias de *rbcl* utilizando 14 géneros (7 americanos y 7 asiáticos), los resultados revelaron un patrón biogeográfico inusual. El clado basal (subfamilia Tristichoideae = familia Tristicaceae) contiene un elemento florístico de Gondwana con *Tristicha* (Australia, Madagascar, África, América tropical) distribuido pantropicalmente y otro género exhibiendo radiaciones en la India y sur/sudeste de Asia. Un segundo taxa basal o clado (subfamilia Podostemoideae = familia Podostemaceae en sentido estricto) está uniformemente distribuido en Centro y Sudamérica (*Apinagia*, *Marathrum*, *Oserya* y *Vanroyenella*). Siguiendo en

orden filogenético están *Podostemum* (sur/norte de América), *Cladopus* (Japón, sureste de Asia), *Zeylanidium*, *Polypleurum* y *Farmeria* (sudeste de Asia e India). De acuerdo con los autores, las afinidades biogeográficas de los géneros de las hierbas de los ríos sugieren que la diversificación de este grupo experimentó una primera radiación tropical (Tristichoideae) y posteriormente la segunda radiación (*Farmeria*, *Polypleurum* y *Zeylanidium*). Por lo tanto, la migración de este grupo de plantas dentro de las provincias florísticas de Laurasia y su subsecuente retorno a mediambientes tropicales es presentada como una hipótesis para explicar su diversificación.

De acuerdo con la información citogenética obtenida en este trabajo y la disponible para las especies de Podostemaceae, se proponen las siguientes tendencias evolutivas. La rama basal de la figura 11 corresponde a la subfamilia Tristichoideae, que presenta el número básico más primitivo ( $x = 10$ ) donde los poliploides son más frecuentes, lo que es congruente con sus características morfológicas primitivas y moleculares. El segundo grupo divergente es el más diverso y evolucionado y corresponde a la subfamilia Podostemoideae, el análisis filogenético disponible (Figura 12) aunado a los datos cromosómicos, apoyan la idea de que se trata de un grupo paleopoliploide y por lo tanto la reducción dispoloide es el mecanismo cromosómico más probable para explicar la variación en los números básicos ( $x = 13, 14, 15$  y  $17$ ) registrados hasta el momento. El análisis cariotípico de las especies de Podostemoideae (Tabla 14) muestra que los eventos cromosómicos durante la evolución del grupo se deben principalmente a las translocaciones.

Es importante señalar que el número cromosómico obtenido para *Tristicha* de  $2n = 20$  y número básico  $x = 10$ , son parámetros citológicos, que aunados a características morfológicas y moleculares, apoyan la separación de este género dentro de la familia Tristichaceae como lo propuso Willis (1914), Cusset & Cusset (1988) y posteriormente Les *et al.* (1997).

Sin embargo, los estudios citogenéticos publicados para la familia Podostemaceae son limitados representando apenas un 18.4% de los conteos cromosómicos a el nivel genérico y por lo tanto son necesarios un mayor número de este tipo de estudios, que permitan esclarecer los eventos genéticos que ocurrieron durante la evolución de las podostemáceas.



Figura 11. Tendencias evolutivas de los números cromosómicos en las dos subfamilias de las Podostemáceas.

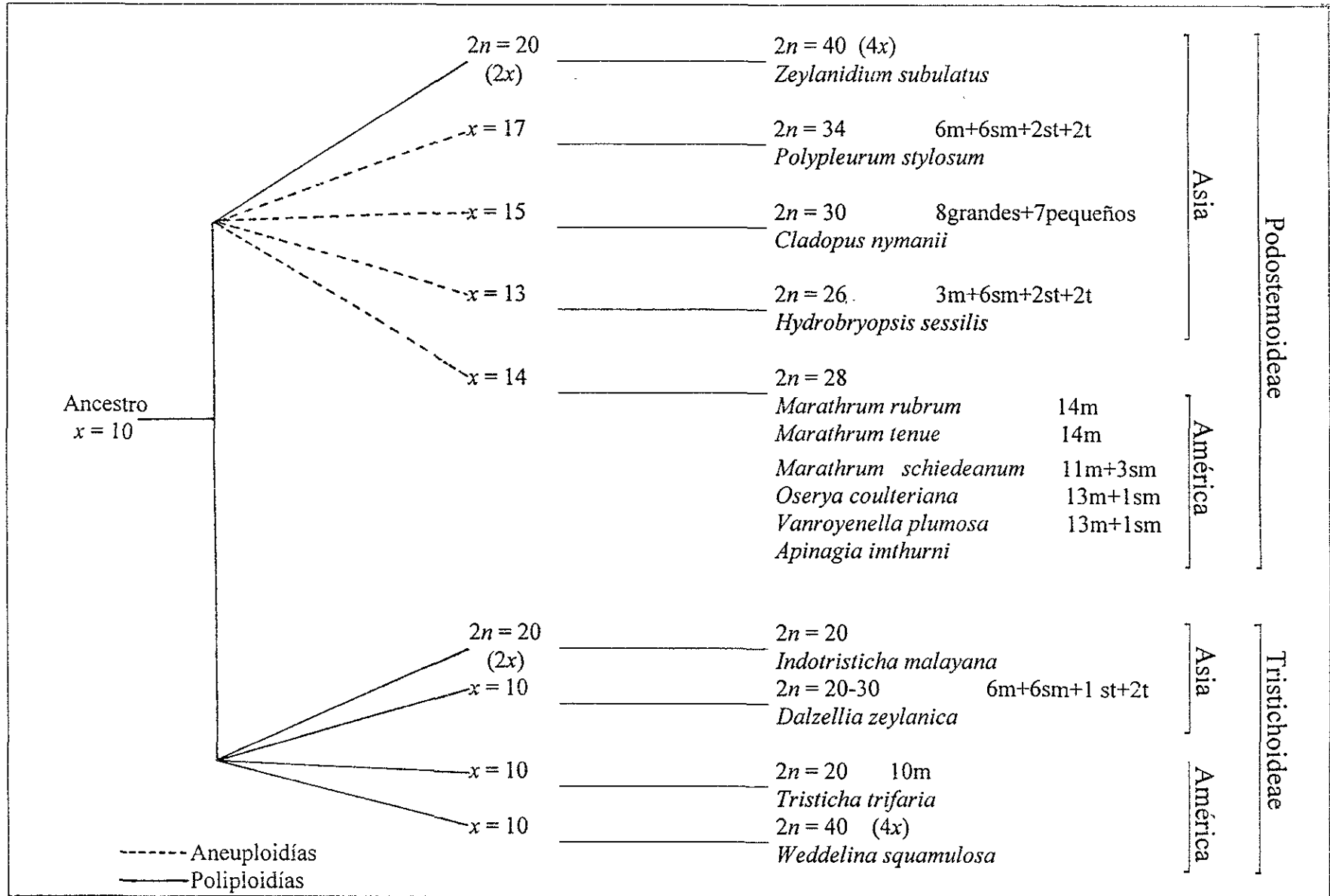
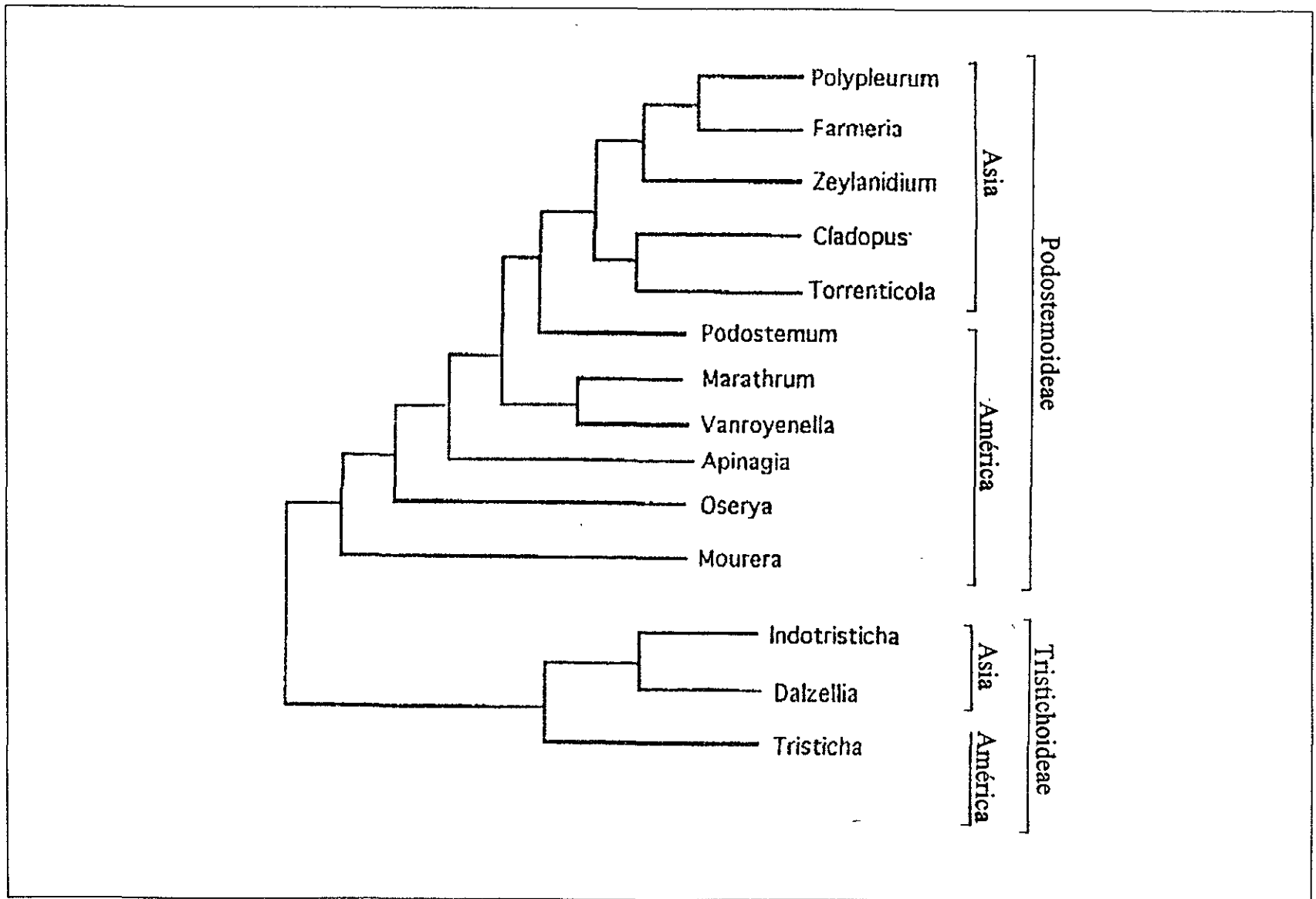


Figura12 Relaciones filogenéticas de las Podostemáceas utilizando secuencias de *rbcL*. Les, Philbrick y Novelo en preparación.



## CONCLUSIONES

1. Se reporta por primera vez el número cromosómico para *Oserya coulteriana* y *Vanroyenella plumosa* (subfamilia Podostemoideae) que es  $2n = 28$  ( $x = 14$ ), estos datos apoyan su relación taxonómica debido a que presentan números cromosómicos del mismo orden de magnitud. El  $x = 14$  probablemente se originó por aneuploidía de algunos de los cromosomas del genomio. Mientras que *Tristicha trifaria* presenta  $2n = 20$  ( $x = 10$ ).
2. Con base en los números cromosómicos obtenidos en este trabajo y los confirmados en la literatura, se propone que la subfamilia Podostemoideae es un grupo paleopoliploide y presenta los números básicos  $x = 13, 14, 15$  y  $17$  (serie disploide), esta variación en el grupo se originó principalmente por aneuploidías debidas a: (1) una división anormal del centrómero, (2) por la incorporación de un par adicional de cromosomas del complemento regular como resultado del retraso durante la división celular y (3) por translocaciones desiguales.
3. De acuerdo a los números cromosómicos de los géneros pertenecientes a la subfamilia Tristichoideae, está presenta un  $x = 10$  y la poliploidía es el principal mecanismo involucrado en la evolución cromosómica de este grupo.
4. El análisis cariotípico de *Oserya coulteriana* y *Vanroyenella plumosa* no presenta diferencias significativas en cuanto a su fórmula cariotípica ya que las dos especies presentan 13 pares de cromosomas metacéntricos y un par de cromosomas submetacéntricos, con índices de simetría TF% de 45.95 y 46.97, respectivamente. Sin embargo se observó que el tamaño del genoma (LTC) es significativamente mayor en *O. coulteriana* con relación a *V. plumosa*, mientras que *Tristicha trifaria* presentó 10 pares de cromosomas metacéntricos en su fórmula cariotípica y un TF% de 48.68.

5. El análisis del tamaño del genoma por citometría de flujo mostró que dos especies de la subfamilia Podostemoideae presentan genomas pequeños ( $2C = 1.01$  pg en *Marathrum rubrum* y  $2C = 2.33$  pg en *Oserya* sp. nov.) considerando el rango de  $2C = 0.4-254.8$  pg conocido para las angiospermas.
  
6. De acuerdo a las características morfológicas, estudios biogeográficos, moleculares y a los citogenéticos obtenidos en este trabajo, se apoya la idea de segregación de las subfamilias Podostemoideae y Tristichoideae a nivel de familias Podostemaceae y Tristichaceae.

**ESTA TESIS NO DEBE  
SALIR DE LA BIBLIOTECA**

## LITERATURA CITADA

- Araki, H. 1975. Cytogenetics of *Scilla scilloides* complex V. The relationship between two adjacent natural population. The nucleus, 18: 1-6.
- Araki, H. 1985. The distribution of diploids and polyploids of the *Scilla scilloides* complex. Bull. Fukuoka Univ. Educ., 26(3): 77-83.
- Araki, H., Hikada S. & Takahashi, S. 1976. Cytogenetics of the *Scilla scilloides* complex. VI. The structures of natural population. Bot. Mag. Tokyo, 89: 83-91.
- Bennett, M. D. 1984. The genome, the natural karyotype, and biosystematics. In: W.F. Grant (ed.). Plant biosystematics. Academic Press, Toronto. p 41-66.
- Bennett, M.D. 1985. Intraspecific variation in DNA amounts and nucleotypic dimension in plant genetics. In: M. Freeling (ed.). UCLA Symp. Mol. Cel. Biol. New. Ser., 35: 283-302.
- Bennett, M.D. 1987. Variation in genomic form in plants and its ecological implications. New Phytol., 106: 177-200.
- Bennett, M.D., Heslop-Harrison, J.S., Smith, J.B. & Ward, J.P. 1983. DNA density in mitotic and meiotic metaphase chromosomes of plants and animals. J. Cell. Sci., 63: 173-179.
- Bennett, M.D. & Leitch, J.I. 1997. Nuclear DNA amounts in angiosperms –583 new estimates. Ann. Bot., 80: 169-196.
- Bennett, M.D. & Smith, J.B. 1976. Nuclear DNA amounts in angiosperms. Philos. Trans., Ser. B. 224: 227-274.
- Bennett, M.D., Smith, J.B. & Heslop-Harrison, J.S. 1982. Nuclear DNA amount in angiosperms. Proc. Roy. Soc., Ser. B., 216: 179-199.
- Bidwell, R.G.S. 1979. Plant physiology. Ed. MacMillan, London. 784 p.
- Cavallini, A. & Natali, L. 1991. Intraspecific variation of nuclear DNA content in plant species. Caryologia, 44 (1): 93-107.
- Chiarugi, A. 1933. Lo sviluppo del gametifito femminile della "*Weddellina squamulosa* Tul." (Podostemaceae). Rend. Accad. Nazl. Lincei., sér. 6A, 17: 1095-1100.
- Conger, A.D. & Fairchild. 1953. A quick-freeze method for making smear slides permanent. Stain Technol., 28: 281-283.

- Cook, C.D.K. 1990. The aquatic plant book. SPB Academic Publishing. The Hague. 228 p.
- Creber, H.M.C., Davies, M.S., Francis, D. & Walker, H.D. 1994. Variation in DNA C value in natural population of *Dactylis glomerata* L. *New Phytol.*, 128: 555-561.
- Cronquist, A. 1981. An integrated system of classification of flowering plants. Columbia Univ. Press. New York. 1262 p.
- Curtis, J. 1986. Microtecnía vegetal. Ed. Trillas. México. 105 p.
- Cusset, C. & Cusset, G. 1988. Etude sur les Podostemales 10. Structures florales et végétatives des Tristichaceae. *Adansonia*, 2: 179-218.
- Darlington, C.D. & Wylie, A.P. 1955. Chromosome atlas of flowering plants. Allen & Unwin (Eds.). London. 520 p.
- De Laat, A.M.M. & Blass, J. 1984. Flow cytometric characterization and sorting of plant chromosomes. *Theoret. App. Genet.*, 67: 463-467.
- Dickson, E.E.K., Arumuganathan, S., Kresovich, S. & Doyle, J.J. 1992. Nuclear DNA content variation within the Rosaceae. *Amer. J. Bot.*, 79: 1081-1086.
- Dolezel, J. 1991. Flow cytometric analysis of nuclear DNA content in higher plant. *Phytoch. Analysis*, 2: 143-154.
- Dolezel, J. 1995. Flow cytometry – principles and applications in mutation breeding. International Atomic Energy Agency Food and Agriculture Organization of the United Nations. 25 p.
- Dolezel, J. 1997a. Application of flow cytometry for the study of plant genomes. *J. Appl. Genet.*, 38 (3): 285-302.
- Dolezel, J. 1997b. Flow cytometry, its application and potential for plant breeding. Current topics in plant cytogenetics related to plant improvement. 80 –90 p.
- Dolezel, J. & Göhde, W. 1995. Sex determination in dioecious plant *Melandrium album* and *Melandrium rubrum* using high-resolution flow cytometry. *Cytometry*, 19: 103-106.
- Dolezel, J., Lucretti S. & Macas, J. 1995. Flow cytometric analysis and sorting of plant chromosomes. *In*: P.E. Brandham and M.D. Bennett (eds.). Kew Chromosome Conference IV. Royal Botanic Gardens Kew. p.185-200.

- Dolezel, J., Sgorbati, S. & Lucretti, S. 1992. Comparison of three DNA fluorochromes for flow cytometric estimation of nuclear DNA content in plants. *Physiol. Pl.*, 85: 625-631.
- Gaiser, L.O. 1930. Chromosome numbers in angiosperms II. *In*: Federov (ed.). Chromosome numbers of flowering plants. Reprint. Otto Koeltz Science Publisher. Federal Republic of Germany. 921 p.
- Galbraith, D.W., Harkins, K.R., Maddox, J.M., Ayres, N.M., Sharma, D.P. & Firoozadaby, E. 1983. Rapid flow cytometric analysis of the cell cycle in intact plant tissues. *Science*, 220: 1049-1051.
- García, V.A. 1985. Sistemas Robertsonianos: su papel en la evolución cromosómica en plantas superiores. *In*: Memorias del seminario sobre la investigación genética básica en el conocimiento y evaluación de los recursos genéticos. Jardín Botánico, Instituto de Biología, UNAM. México. p 41-53.
- García, A. 1990. Manual de técnicas de citogenética. Colegio de Posgraduados, Chapingo, México. 196 p.
- Gardner, G. 1847. Observations on the structure and affinities of the plants belonging to the natural order Podostemaceae, together with a monograph of the Indian species. *Calcutta. J. Nat. Hist.*, 7(26): 165-189.
- Gardner, J.E., Simmons, J.M. & Snustad, P.D. 1991. Principles of genetics. John Wiley and Sons. New York. 579 p.
- George, E.F. 1993. Plant propagation by tissue culture. Part. I. The technology. Exegetic Ltd. England. p 420-433.
- Gilles, A. & Randolph, L.F. 1951. Reduction in quadrivalent frequency in autotetraploid maize during a period of 10 years. *Amer. Jour., Bot.* 38: 12-16.
- Grant, V. 1989. Especiación vegetal. Ed. Limusa, México. 587 p.
- Grime, J.P., Shacklock, J.M.L. & Band, S.R. 1985. Nuclear DNA contents, shoot phenology and species co-existence in limestone grassland community. *New Phytol.*, 100: 435-445.
- Hutchinson, J. 1926. Families of flowering plants. I. Dicotyledons. Ed. MacMillan, London. 326 p.
- Jackson, B.C. 1971. The karyotype in systematics. *Ann. Rev. Ecol. Syst.*, 2: 327-368.
- John, B. 1976. Population cytogenetic. Ed. Arnold. The Camelot Pass. Ltd. Sout. Ampton, England. 76 p.

- Jones, K. 1978. Aspects of chromosome evolution in higher plants. *In*: H.W. Woolhouse (ed.). *Advances Bot. Res.* Academic press Inc., London. Vol. 6. p. 120-194.
- Kenton, A. 1984. Chromosome evolution in the *Gibasis linearis* group (Commelinaceae). III. DNA variation, chromosome evolution and speciation in *G. venestula* and *G. heterophylla*. *Chromosoma*, 90: 303-310.
- Kenton, A. 1986. Importancia de los cromosomas en la especiación y evolución como base para el conocimiento y caracterización de las especies vegetales con valor potencial. *In*: III Seminario Maximino Martínez. La aplicación de la citogenética en el conocimiento biológico de los recursos vegetales en México. Jardín Botánico del Instituto de Biología, UNAM. México. p. 11-36.
- Lacadena, J.R. 1988. *Genética*. Ed. A.G.E.S.A. Madrid, España. 1303 p.
- Les, D. & Philbrick, C.T. 1993. Studies of hibridization and chromosome number variation in aquatic angiosperms. *Aquat. Bot.*, 44: 181-228.
- Les, D., Philbrick, C.T. & Novelo, R.A. 1997. The phylogenetic position of river-weeds (Podostemaceae): Insights from *rbcL* sequence data. *Aquat. Bot.*, 57: 5-27.
- Levan, A., Fredga, K. & Sandberg, A.A. 1964. Nomenclature for centromeric position on chromosomes. *Hereditas*, 52: 201-220.
- Lewitsky, G.A. 1931. The karyotype in systematics. *Bull. Appl. Bot. Gen. Pl. Breed.*, 27(1): 220-240.
- Lindley, J. 1830. *An introduction to the natural system of Botany*. Longman, Rees Orme, Brown and Green, London. 326 p.
- Magnus, W. 1913. Die atypische embryoentwicklung des Podostemaceen. *Flora*, 105: 275-336.
- Martinez, J. & Palomino, G. 1996. Karyotipe analysis in the tree new species of *Echeandia* (Liliaceae) and cytotypes of *E. Reflexa*. *Cytologia*, 61: 215-223.
- Martínez, J. & Palomino, G. 1997. Evidence of heterozygous chromosome interchange and chromatid exchange in autotetraploid cytotype of *Gibasis schiedeana* (Tredescantieae-Comelinaceae). *Cytologia*, 62: 275-281.
- Mauritzon, J. 1933. Über die syst. stellung de familien Hydrostachyaceae und Podostemaceae. *Bot. Not.*, 9: 172-180.



- Melamed, M.R., Mullaney, P.F. & Mendelson, M.L. 1979. Flow cytometry and sorting. John Wiley and Sons (eds.). New York. 37 p.
- Mercado, P. y Lira, R. 1994. Contribución al conocimiento de los números cromosómicos de los géneros *Sechium* P.B. y *Sicana* Naudin (Cucurbitaceae). Acta Bot. Mex., 27: 7-13.
- Moore, D. M. 1979. Citogenética vegetal. Ed. Omega, Barcelona, España. 64 p.
- Morán, R. 1949. Why count chromosomes?. Desert Pl. Life., 21: 21-27.
- Murashige, T. & Skoog, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue. Physiol. Plant., 15: 473-494.
- Murguía, S.G., Novelo, R.A., Philbrick, C.T. & Márquez, G. Embryology of *Vanroyenella plumosa* (Podostemaceae, Podostemoideae). En prensa.
- Novelo, R.A. & Philbrick, C.T. 1993. *Vanroyenella*, a new genus of Podostemaceae from Jalisco, Mexico. Syst. Bot., 18: 64-67p.
- Novelo, R.A. & Philbrick, C.T. 1995. A new species of *Oserya* (Podostemaceae) from Jalisco, Mexico. Novon, 5(1): 54-56.
- Novelo, R.A. & Philbrick, C.T. 1997. Taxonomy of Mexican Podostemaceae. Aquat. Bot., 57: 275-303.
- Okada, H. 1991. Karyomorphological studies of *Cladopus nymani* H. Möll. and *Indotristicha malayana* Pransf. et Whitmore (Podostemaceae sensu lato) from Malesian wet tropics. J. Jap. Bot., 66: 205-210.
- Oropeza, N., Mercado-Ruaro, P., Novelo, R.A. & Philbrick C.T. 1998. Karyomorphological studies of Mexican species of *Marathrum* (Podostemaceae). Aquat. Bot., 62: 207-211.
- Otto, F. 1990. DAPI staining of fixed cells for high-resolution flow cytometry of nuclear DNA. In: Crissman, H.A. and Darzynkiwicz, Z. (eds.). Methods in Cell Biology Academic Press. New York. 33:105-110.
- Palomino, H.G. 1986. La aplicación de la citogenética en el conocimiento biológico de los recursos genéticos. In: Memorias del III seminario Maximino Martínez: La aplicación de la citogenética en el conocimiento biológico de los recursos vegetales en México. Jardín Botánico, Instituto de Biología. UNAM, México. p. 1-10.
- Palomino, G. & Quero, H. 1992. Karyotype analysis of three species of *Sabal* L. (Palmae: Coryphoideae). Cytologia, 57: 485-489.

- Palomino, H.G. 1995. Estudios citogenéticos de plantas mexicanas. Plantas, Biotecnología, Agronomía, Nutrición. COFAA-IPN. México. 11 p.
- Philbrick, C.T. 1984. Aspects of floral biology, breeding systems, and seed and seedling biology in *Podostemum ceratophyllum* (Podostemaceae). *Aquat. Bot.*, 9(2): 166-174.
- Philbrick, C.T. & Crow, G.E. 1983. Distribution of *Podostemum ceratophyllum* Michx. (Podostemaceae). *Rhodora*, 85(843): 325-342.
- Philbrick, C.T. & Novelo, R.A. 1993. River-weeds: A fascinating family of aquatic flowering plants. *Aquaphyte*, 13(1): 1-7.
- Philbrick, C.T. & Novelo, R.A. 1994. Seed germination of Mexican Podostemaceae. *Aquat. Bot.*, 48: 145-151.
- Philbrick, C.T. & Novelo, R.A. 1995. New world Podostemaceae: Ecological and evolutionary enigmas. *Brittonia*, 47 (2): 210-222.
- Philbrick, C.T. & Novelo, R.A. 1997. Ovule number, seed number and seed size in Mexican and North American species of Podostemaceae. *Aquat. Bot.*, 57: 183-200.
- Price, H.J. 1976. Evolution of ADN content in higher plants. *Bot. Rev.*, 42: 27-52.
- Price, H. J. 1988. Nuclear DNA content variation within angiosperms species. *Evolution*, 2(1): 53-60.
- Quiroz, F., Novelo, R.A. & Philbrick, C.T. 1997. Water chemistry and the distribution of Mexican Podostemaceae: a preliminary evaluation. *Aquat. Bot.*, 57: 201-211.
- Richard, L.C. 1815. Podostemaceae (Podostemeae). *In: Humboldt, Bonpland & Kunth (eds.). Nova gen. et species plantarum.*, I: 246.
- Rieger, R.A., Michelis, M. & Green, M. 1982. Diccionario de genética y citogenética. Alhambra, Madrid. 530 p.
- Robertis, E.D.P. y Robertis, E.M.P. 1990. Biología celular y molecular. Ed. Ateneo. Argentina. 530 p.
- Romo, C.V., Scogin, R., Philbrick, C.T. & Novelo, R.A. 1993. A phytochemical study of selected Podostemaceae: systematic implications. *Aliso*, 13(4): 513-520.
- Royen, P. van. 1950. Podostemonaceae. *Ann. Missouri Bot. Gard.*, 37(2):124-237.

- Royen, P. van. 1951. The Podostemaceae of the New World, Part. I. Med. Bot. Mus. Utrecht., 107: 1-51.
- Royen, P. van. 1954. Podostemaceae of the New World, Part. III. Acta Bot. Neerl., 2 (1):1-21.
- Rutishauser, R. 1997. Structural and developmental diversity in Podostemaceae (river-weeds). Aquat. Bot., 57:29-70.
- Rutishauser, R., Novelo, R.A. & Philbrick, C.T. 1999. Developmental morphology of new world Podostemaceae: *Marathrum* and *Vanroyenella*. Int. J. Plant Sci. 160(1): 29-45.
- Sáez, F.A. y Cardoso, H. 1978. Citogenética básica y biología de los cromosomas. Ed. O.E.A. Washington, E.U.A. 124 p.
- Schleiden, M.J. 1939. Über Bildung des Eichens und Entstehung des Embryos bei den Phanerogamen. Nova Acta Phys.-Med. Acad. Caes. Leop.-Car., 11: 114-117.
- Sehgal, A., Mohan Ram, H.Y. & Bhatt, J.R. 1993. In vitro germination growth, morphogenesis and flowering of an aquatic angiosperm, *Polypleurum stylosum* (Podostemaceae). Aquat. Bot., 45: 269-283.
- Sgorbati, S., Levi M., Sparvoli, E., Trezzi, F. & Luchinni, G. 1986. Cytometry and flow cytometry of 4',6 -diamidino-2-phenylindole (DAPI) -stained suspensions of nuclei released from fresh and fixed tissues of plants. Physiol. Pl., 68: 471- 476.
- Sinha, S.S.N. & Roy, H. 1979. Cytological studies in the genus *Phaseolus*. I. Mitotic analysis in fourteen species. Cytologia, 44: 191-199.
- Singh, R. J. 1993. Plant cytogenetics. Ed. C.R.C., Estados Unidos. 391 p.
- Soltis, P. 1998. The genetic consequences of polyploidy: key to the success of polyploids in nature?. Amer. J. Bot., 85(6): 63.
- Stace, C.A. 1980. Plant taxonomy and biosystematics. Ed. Edward Arnold. Great Britain, Inglaterra. 279 p.
- Stebbins, G.L. 1971. Chromosomal evolution in higher plants. Ed. Edward Arnold, London. 216 p.
- Swason, C.P., Merz, T. y Young, W.J. 1968. Citogenética. Ed. U.T.E.H.A. México. 321 p.
- Swift, H. 1950. The constancy of deoxyribose nucleic acid in plant nuclei. Proc. Natl. Acad., 36: 643-654.

- Takhtajan, A.L. 1980. Outline of the classification of flowering plants (magnoliophyta). Bot. Rev., 46: 225-359.
- Udeal, K., Hanyuda, Y., Nakano, T., Shluchi, T., Seo A., Okubo H. & Hotta, M. 1997. Molecular phylogenetic position of Podostemaceae, a marvelous aquatic flowering plant family. J. Plant Res., 110: 87-92.
- Uniyal, P.L. & Mohan Ram, H.Y. 1994. Karyomorphological studies in some members of Podostemaceae. Aquat. Bot., 47: 85-90.
- Vidyashankari, B. & Mohan Ram, H.Y. 1987. In vitro germination and origen of thallus in *Griffithella hookeriana* (Podostemaceae). Aquat. Bot., 28: 161-169.
- Warming, E. 1890. Podostemaceae. In: Engler, A. and Prantl, K. (eds.). Die natürlichen Pflanzenfamilien. Leipzig, Alemania. Vol. III: 1-22.
- Willis, J.C. 1915. A new natural family of flowering plants Tristichaceae. J. Linn. Soc. Bot., 43: 49-54.
- Willis, J.C. 1926. The evolution of the Tristichaceae and Podostemaceae. Ann. Bot., 40: 349-367.
- White, M.J.D. 1957. Cytogenetics and systematic entomology. Ann. Rev. Entomol., 2: 71-90.
- Wyman, J. Laliberté, S. & Tremblay, M.F. 1997. Nuclear DNA content variation in seeds from 22 halfsib families of jack pine (*Pinus banksiana*, Pinaceae). Amer. J. Bot., 84(10):1351-1361.

## APENDICE

Ejemplares de referencia depositados en el Herbario Nacional (MEXU).

### *Marathrum rubrum* Novelo y Philbrick.

JALISCO. Mpio.: Cabo Corrientes. Localidad: Río Horcones, a aproximadamente 17 km al sur de Puerto Vallarta. Altitud aprox., 375 m. Hábitat: Creciendo sobre las rocas de granito, en río de agua clara y con fuerte corriente. Colectores: Novelo, R.A., Oropeza, H.N. y Ramos V.L. No. de colecta: **02429**. Fecha de colecta: 15 Abr. 1998.

### *Oserya coulteriana* Tul.

GUERRERO. Mpio.: Placeres del Oro. Localidad: Río del Oro, junto al poblado Placeres del Oro, aprox. 30 km al SW de Cd. Altamirano. Altitud 250 m. Hábitat: Creciendo sobre las piedras en río limpio y con corriente. Colectores: Novelo, R.A., Ramos, V.L., Rutishauser, R., Oropeza, H.N. y Murguía, G. No. de colecta: **01449**. Fecha de colecta: 19 Mar., 1996.

JALISCO. Mpio.: Cabo Corrientes. Localidad: Río Horcones, en el puente sobre el río, a aprox. 27 km al sur de Puerto Vallarta. Altitud aprox. 350 m. Hábitat: Creciendo sobre las rocas de granito, en río de agua limpia y con corriente. Colectores: Novelo, R.A., Ramos, V.L., Oropeza, N., Murguía, G. y García, A. No. de colecta: **01826**. Fecha de colecta: 19 Mar. 1997. Mpio.: El Tuito. Localidad: Río las Juntas, 2 km al sur de Tuito rumbo a Chamela Altitud; aprox. 100 m. Hábitat: Creciendo sobre las rocas, en río limpio y con corriente. Colectores: Novelo, R.A., Ramos, V.L., Oropeza, N., Murguía, G. y García, A. No. de colecta: **01830**. Fecha de colecta: 20 Mar. 1997. Mpio.: Cabo Corrientes. Localidad: Río Horcones, en el puente sobre el río, a aproximadamente 17 km al sur de Puerto Vallarta. Altitud aprox. 375 m. Hábitat: Creciendo sobre las rocas de granito, en río de agua limpia y con fuerte corriente. Colectores: Novelo, R.A. No. de colecta: **01994**. 1º Ago. 1997. Mpio.: Cabo Corrientes. Localidad: Río Horcones, a aprox. 17 km al sur de Puerto Vallarta. Altitud aprox., 375 m. Hábitat: Creciendo sobre las rocas de granito, en río de agua clara y con fuerte corriente. Colectores: Novelo, R.A. con Oropeza, H.N. y Ramos V.L. No. de colecta: **02430**. Fecha de colecta: 15 Abr. 1998.

### *Oserya* sp. nov.

TAMAULIPAS. Mpio.: Ciudad Victoria. Localidad: Aproximadamente 7 km al oeste de Ciudad Victoria. Hábitat: creciendo sobre las rocas de granito, en río de agua limpia. Colectores: Novelo, R.A. No. de colecta: **02853**. Fecha de colecta: 1 Ago., 1998.

### *Podostemum ricciiforme* (Liebm.) Royen

OAXACA. Mpio.: Usila. Localidad: Río Usila, junto al puente en el poblado del mismo nombre, aprox. 105 km al suroeste de Tuxtepec. Altitud 120 m. Hábitat: Creciendo en las rocas del borde del río, en agua limpia y con corriente. Colectores: Novelo, R.A. y Ramos, V.L. No. de colecta: **01833**. Fecha de colecta: 13 May. 1997.

TABASCO. Mpio.: Huimanguillo. Localidad: Río Pedregal, a la altura de la población llamado Carlos A. Madrazo, en los límites de los estados de Veracruz y Tabasco. Altitud 127 m. Hábitat: Creciendo adherida sobre las rocas en río limpio y con corriente. Colectores: Novelo, R.A. y Ramos, V.L. No. de colecta: **02060**. Fecha de colecta: 9 Feb., 1998.

*Vanroyenella plumosa* Novelo & Philbrick

OAXACA. Mpio.: San Gabriel Mixtepec. Localidad: Río Rana o El Casquito, 3.3 km al norte de San Gabriel Mixtepec y a 48 km al norte de Puerto Escondido. Altitud 670 m. Hábitat: Creciendo sobre las rocas, en río limpio y con fuerte corriente. Colectores: Novelo, R.A., Philbrick, T., Crow, G. y Oropeza, N. No. de colecta: **01392**. Fecha de colecta: 10 Dic., 1994. Mpio.: San Gabriel Mixtepec. Localidad: Río rana o El Casquito, 3.5 km al norte de San Gabriel Mixtepec. Altitud 670 m. Hábitat: Creciendo sobre las rocas, en río limpio, con fuerte corriente en zona de rápidos. Colectores: Novelo, R.A., Ramos V.L.; Oropeza, N.; Murguía, G. **01821**. Fecha de colecta: 3 Dic., 1996.

JALISCO. Mpio.: Cabo Corrientes. Localidad: Río Horcones, en el puente sobre el río, a aprox. 27 km al sur de Puerto Vallarta. Altitud aprox. 350 m. Hábitat: Creciendo sobre las rocas de granito, en río de agua limpia y con corriente. Colectores: Novelo, R.A., Ramos, V.L., Oropeza, N., Munguía, G. y García, A. No. de colecta: **01828**. Fecha de colecta: 19 Mar. 1997.

*Tristicha trifaria* (Bory ex Willd.) Sprengel

OAXACA. Mpio.: San Gabriel Mixtepec. Localidad: Río El Casquito o Rana, 3.5 km al norte de San Gabriel Mixtepec. Altitud 670 m. Hábitat: Creciendo sobre las rocas, en río limpio, con fuerte corriente en zona de rápidos. Colectores: Novelo, R.A., Ramos V.L., Oropeza, N., Murguía, G. No. de colecta: **01823**. Fecha de colecta: 3 Dic., 1996.

JALISCO. Mpio.: Cabo Corrientes, Río Horcones, en el puente sobre el río, a aproximadamente 27 km al sur de Puerto Vallarta. Altitud Aprox. 350 m. Hábitat: Creciendo sobre rocas de granito, en río de agua limpia y con corriente. Colectores: Novelo, R.A. con Ramos, V.L., Oropeza, N., Murguía, G. y García, A. No. de colecta: **01827**. Fecha de colecta: 19 Mar. 1997.

OAXACA. Mpio.: Usila. Localidad: Río Usila, junto al puente en el poblado del mismo nombre. Aprox. 105 km al suroeste de Tuxtepec. Altitud 120 m. Hábitat: Creciendo en las rocas del borde del río, en agua limpia y con corriente. Colectores: Novelo, R.A. con Ramos, V.L. No. de colecta: **01835**. Fecha de colecta: 13 May. 1997.

TABASCO. Mpio.: Huimanguillo. Localidad: Río Pedregal, a la altura de la población llamado Carlos A. Madrazo en los límites de los estados de Veracruz y Tabasco. Altitud 127 m. Hábitat: Creciendo adherida sobre las rocas en río limpio y con corriente. Colectores: Novelo, R.A. con Ramos, V. L. No. de colecta: **02062**. Fecha de colecta: 9 Feb., 1998.