

ESTUDIOS CROMOSÓMICOS EN ESPECIES DE *RHYNCHOSPORA* Y *PLEUROSTACHYS* (CYPERACEAE)*

LAURA P. DOPCHIZ^{1,2}, LIDIA POGGIO^{1,2} y ENCARNACIÓN R. GUAGLIANONE³

Summary: Chromosome studies in species of *Rhynchospora* and *Pleurostachys* (Cyperaceae). The karyotype of three taxa of *Rhynchospora* Vahl: *R. corymbosa* (L.) Britton var. *asperula* (Nees) Kük. ($2n = 18$), *R. corymbosa* var. *organensis* (C. B. Clarke) Kük. ($2n = 18$), and *R. marisculus* Nees ($2n = 30$), are analyzed and reported for the first time. All the taxa studied possess holocentric chromosomes. The chromosome number of *R. corymbosa* var. *corymbosa* ($2n = 18$) is confirmed and a new number is reported for *R. tenuis* Link ($2n = 18$). These results are the first records in Argentinean plants. In addition, the karyotypes of three species of *Pleurostachys* Brongn.: *P. densefoliata* H. Pfeiff. ($2n = 10$), *P. gaudichaudii* Brongn. ($2n = 16$), and *P. urvillei* Brongn. ($2n = 10$), in material from Brazil, are analyzed and given for the first time.

Key words: *Rhynchospora*, *Pleurostachys*, Cyperaceae, cytotaxonomy, holocentric chromosomes.

Resumen: Se analizan los cariotipos y se comunican por primera vez los números cromosómicos de tres taxones del género *Rhynchospora* Vahl (Cyperaceae): *R. corymbosa* (L.) Britton var. *asperula* (Nees) Kük. ($2n = 18$), *R. corymbosa* var. *organensis* (C. B. Clarke) Kük. ($2n = 18$) y *R. marisculus* Nees ($2n = 30$). Todos los taxones estudiados poseen cromosomas holocéntricos. Se confirma el número cromosómico de *R. corymbosa* var. *corymbosa* ($2n = 18$) y se da un nuevo número para *R. tenuis* Link ($2n = 18$). Estos registros constituyen los primeros recuentos en plantas de Argentina. También se analizan los cariotipos y se dan por primera vez los números cromosómicos de tres especies del género *Pleurostachys* Brongn., *P. densefoliata* H. Pfeiff. ($2n = 10$); *P. gaudichaudii* Brongn. ($2n = 16$) y *P. urvillei* Brongn. ($2n = 10$) en material proveniente de Brasil.

Palabras clave: *Rhynchospora*, *Pleurostachys*, Cyperaceae, citotaxonomía, cromosomas holocéntricos.

INTRODUCCIÓN

Rhynchospora Vahl (Cyperaceae) es un género con aproximadamente 250 especies, ampliamente distribuidas en las regiones templadas, tropicales y subtropicales, con la mayor concentración de especies en el continente americano. En Argentina y Paraguay se encuentra representado por 25 y 30 especies, respectivamente. Comprende 2 subgéneros: *Haplostylis* (Nees) Pax y *Rhynchospora*. *Haplostylis* se caracteriza por poseer un estilo indiviso o apenas bifido en el ápice mientras que en *Rhynchospora* el estilo es profundamente bifido. Kükenthal (1949-1951) estableció 28 secciones para el género, 11 de las cuales se encuentran en la Argentina, tomando en cuenta caracteres de la

inflorescencia, estructura y agrupación de las espiguillas, número de flores, presencia o ausencia de setas perigónicas, forma y superficie del aquenio y de la estilobase.

Pleurostachys Brongn. es un género afín a *Rhynchospora*, está representado por aproximadamente 30 especies en Sudamérica tropical y no se encuentra en la Argentina. La posición taxonómica de *Pleurostachys* ha sido discutida; Benthams & Hooker (1883) y Pax (1887) han sustentado su inclusión en el género *Rhynchospora*, mientras que autores como Clarke (1908), Pfeiffer (1935), Kükenthal (1952), Barros (1960) y Goetghebeur (1998), entre otros, lo mantienen como género, criterio que se sigue en este trabajo. *Pleurostachys* se reconoce por sus setas perigónicas rojizas, alopecuroides, es decir densamente plumosas hacia el ápice y por sus 2 ramas estigmáticas lineares, papilosas, que se implantan directamente sobre la estilobase, persistente y continua con el aquenio.

El género citológicamente más estudiado de Ciperáceas ha sido *Carex* L. y una de las características más relevantes del mismo, así como de otros géneros de la familia, es la presencia de cromosomas holocéntricos.

*Dedicado al Prof. Dr. Juan H. Hunziker en ocasión de su 75º aniversario.

¹Instituto Fiotécnico de Santa Catalina (FCAF, UNLP), Centro de Investigaciones Genéticas (UNLP-CONICET-CIC) C. C. 4, 1836, Llavallol, Buenos Aires, Argentina.
e mail: dopchiz@mail.retina.ar

²Departamento de Ciencias Biológicas (FCEN, UBA), 1428, Buenos Aires, Argentina.

³Instituto de Botánica Darwinion-CONICET, Labardén 200, C.C. 22, B1642HYD, San Isidro, Buenos Aires, Argentina.

Existen pocos datos citogenéticos sobre *Rhynchospora* (Tanaka, 1949; Nijalingappa *et al.*, 1978; Thomas, 1984; Vanzela *et al.*, 1996; Luceño *et al.*, 1998) y ninguno sobre géneros afines como *Pleurostachys*.

Como parte de un estudio citotaxonomico de las especies de *Rhynchospora* de la Argentina y géneros afines se analizan citológicamente en este trabajo, 5 taxones de *Rhynchospora* y 3 de *Pleurostachys*. En *Rhynchospora* se estudiaron tres taxones que pertenecen al subgénero *Haplostylis*, sección *Longirostres* Kunth: *R. corymbosa* (L.) Britton var. *corymbosa*, *R. corymbosa* var. *asperula* (Nees) Kük. y *R. corymbosa* var. *organensis* (C. B. Clarke) Kük. Del subgénero *Rhynchospora* (=Diplostyleae Kük.) se estudiaron: *R. marisculus* Nees, de la sección *Marisculae* Kük. y *R. tenuis* Link, de la sección *Campylorhachis* Benth. (=sección *Tenuis* Kük.). En el género *Pleurostachys* se han estudiado: *P. urvillei* Brongn. y *P. gaudichaudii* Brongn., pertenecientes a la sección *Martianae* H. Pfeiff. y *P. densefoliata* H. Pfeiff. de la sección *Angustifoliae* Kük.

En este trabajo se analiza el comportamiento mitótico y cariotipo en cuanto al número y tamaño cromosómico, índice de asimetría, presencia de constricciones secundarias y naturaleza holocéntrica de sus cromosomas. Asimismo, se analiza el aporte de estos datos a la resolución de problemas taxonómicos.

MATERIALES Y MÉTODOS

Los materiales estudiados se encuentran depositados en el herbario del Instituto de Botánica Darwinion (SI). Para la división infragenérica de *Rhynchospora* y *Pleurostachys* se ha seguido el criterio de Kükenthal (1949-1952) considerando los cambios nomenclaturales propuestos para *Rhynchospora* por Kern (1958). Los materiales se detallan a continuación:

Materiales estudiados

Rhynchospora

Subgénero *Haplostylis*

Sección *Longirostres*

R. corymbosa var. *asperula*

ARGENTINA. Prov. Entre Ríos: Dpto. Federación, Santa Ana, 11-12-1994, Guaglianone *et al.*

2794. Prov. Misiones: Dpto. Capital, Bañado Zaiman, 23-11-1995, Guaglianone *et al.* 3054.

R. corymbosa var. *corymbosa*

ARGENTINA. Prov. Entre Ríos: Dpto. Concordia, Calabacillas, 11-12-1994, Guaglianone *et al.* 2798; Dpto. Colón: El Viejo Molino, 2-12-1995, Guaglianone *et al.* 3058.

R. corymbosa var. *organensis*

ARGENTINA. Prov. Buenos Aires: Isla Martín García: Selva septentrional costera, 26-10-1996, Guaglianone & Dopchiz 3108. Pdo. Campana, Otamendi, 25-10-1997, Guaglianone & Dopchiz 3111.

Subgénero *Rhynchospora*

Sección *Marisculae*

R. marisculus

ARGENTINA. Prov. Entre Ríos: Dpto. Concordia, Calabacillas, 12-12-1998, Guaglianone & Dopchiz 3168. Prov. Misiones: Dpto. Gral. Belgrano, Nacientes del río Pepirí Guazú, 19-11-1995, Guaglianone *et al.* 2948.

Sección *Campylorhachis*

R. tenuis

ARGENTINA. Prov. Corrientes: Dpto. Mburucuyá, Ea. Santa Teresa, Potrero 5, 23-11-1997, Vanni *et al.* 4100.

Pleurostachys

Sección *Angustifoliae*

P. densefoliata

BRASIL. Santa Catarina. Blumenau, Pque. Municipal São Francisco, 24-07-99, Guaglianone & Sobral 3207.

Sección *Martianae*

P. gaudichaudii

BRASIL. Santa Catarina: Pque. Botânico Do Morro-Baú, Municipio de Ilhota y Luís Alvez, 24-07-1999, Guaglianone & Sobral 3215.

P. urvillei

BRASIL. Santa Catarina: Blumenau, Pque.

Municipal São Francisco, 22-07-1999, Araujo *et al.* 1202; Pque. Botânico Do Morro-Baú, Municipio de Ilhota y Luís Alvez, 24-07-1999, Guaglianone *et al.* 3206.

Estudios mitóticos

Se analizaron cromosomas mitóticos de ápices de raíces obtenidas de plantas, pretratadas con colchicina al 0,5% durante 50 min. y fijadas en 3:1 (alcohol absoluto: ácido acético glacial). Además, en material no pretratado y fijado directamente en 3:1, se analizaron los distintos estadios de la mitosis. La tinción se realizó hidrolizando las raíces en HCl 5N durante 20 min. a 20°C y tiñendo luego con el reactivo de Feulgen (pH 2,2) durante 90 min. La coloración fue reforzada con hematoxilina acética 2% (Núñez, 1968). Se determinó la longitud cromosómica total (LCT) utilizando un Analizador de Imágenes Minimop (Kontron), sobre fotomicrografías. La media de los valores de cada carácter cromosómico fue calculada a partir de las mediciones realizadas en un mínimo de cinco células de cada especie. Para estimar la asimetría intercromosómica fue utilizado el índice A_2 ($A_2 = s / \bar{x}$) de Romero Zarco (1986), siendo s el desvío standard y \bar{x} la media de la longitud cromosómica total. El índice A_2 es independiente del tamaño de los cromosomas y no tiene unidad de medida.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Dentro del género *Rhynchospora* las especies de la sección Longirostres se caracterizan por ser plantas rizomatosas, de tallos foliosos en general robustos, hojas membranáceas a subcoriáceas e inflorescencias amplias, una terminal acompañada de 1-3 (-9) coflorescencias laterales en la axila de las hojas superiores, con numerosas espiguillas reunidas en fascículos o glomérulos densos en el extremo de los ejes, rara vez reducida a un solo glomérulo apical. Dentro de esta sección, *R. corymbosa* es una especie cosmopolita y las 3 variedades estudiadas presentaron $2n = 18$ (Tabla 1, Fig. 1 A-C). Nuestros resultados en *R. corymbosa* var. *corymbosa* (Fig. 1 B) coinciden con recuentos previos para poblaciones de la India (Nijalingappa *et al.*, 1978), Nigeria

(Baquar, 1978) y Brasil (Luceño *et al.*, 1998). Se dan por primera vez los números cromosómicos de *R. corymbosa* var. *asperula* (Fig. 1 A), y *R. corymbosa* var. *organensis* (Fig. 1 C).

En las poblaciones estudiadas de las tres variedades no se observaron constricciones secundarias debido, probablemente, al grado de contracción de los cromosomas; tampoco se observaron diferencias en la longitud total de los cromosomas ni en la simetría de sus cariotipos (Tabla 1). Los valores de A_2 son muy bajos indicando una elevada simetría en estos cariotipos.

Las variedades de *R. corymbosa* se reconocen por caracteres morfológicos relativos a la inflorescencia y los aquenios; sin embargo, estas diferencias, no se ven reflejadas en los datos citogenéticos obtenidos hasta el momento (Tabla 1). La estabilidad del número básico, $x = 9$, sugiere que la agmatoploidía no habría sido un mecanismo preponderante en la evolución cromosómica como ya fuera sugerido por Moore (1998) al analizar otras especies de la misma sección.

Rhynchospora marisculus (Marisculae) se encuentra distribuida en América Central, Antillas y América del Sur, y se reconoce por sus aquenios ligeramente obovoides y estilobase cónica, ampliamente superados por las setas perigónicas (Guaglianone, 1979). Las dos poblaciones analizadas presentan $2n = 30$, cromosomas muy pequeños (1,1- 2,7 μ m) y un cariotipo simétrico (Tabla 1, Fig. 1 D). El elevado número cromosómico y el pequeño tamaño de los mismos podría sugerir la ocurrencia de fragmentación a partir de especies con menor número cromosómico, aunque no puede descartarse la ocurrencia de poliploidía (a partir de antecesores con cromosomas pequeños) ya que la misma no es infrecuente en el familia (Heilborn, 1932; Tanaka, 1949; Davis, 1956; Hoshino, 1992).

Rhynchospora tenuis (Campylorhachis) es una especie muy variable, de espiguillas paucifloras, aquenio obovoide, rostro deprimido, y sin sedas perigónicas. Se encuentra desde México hasta América del Sur, llegando al N y E de la Argentina, en las provincias de Jujuy, Misiones, Corrientes y Entre Ríos.

La población analizada de *R. tenuis* presenta $2n = 18$ (Fig. 1 E) con al menos 3 pares de cromosomas con satélites terminales (Fig. 1 H-J), posee la mayor longitud cromosómica total (LCT) de las especies estudiadas y un cariotipo levemente asimétrico (Tabla 1).

Tabla 1. Números cromosómicos (2n), longitud cromosómica total (LCT) e índice de asimetría intercromosómica (A₂) de las especies estudiadas de *Rhynchospora* y *Pleurostachys*.

Género	Subgénero	Sección	Especie	2n	LCT (µm)	A ₂
<i>Rhynchospora</i>	Haplostylis	Longirostres	<i>R. corymbosa</i> var. <i>asperula</i>	18	53.39	0.25
			<i>R. corymbosa</i> var. <i>corymbosa</i>	18	52.84	0.23
			<i>R. corymbosa</i> var. <i>organensis</i>	18	55.08	0.26
	Rhynchospora	Marisculae	<i>R. marisculus</i>	30	40.30	0.27
		Campylorhachis	<i>R. tenuis</i>	18	86.53	0.29
<i>Pleurostachys</i>		Angustifoliae	<i>P. densefoliata</i>	10	29.27	0.28
		Martianae	<i>P. gaudichaudii</i>	16	40.88	0.39
			<i>P. urvillei</i>	10	34.23	0.19

Gadela & Kliphuis (1964) comunicaron 2n = 10 para una población de Surinam mientras que Vanzela *et al.* (1996) encontraron varias poblaciones en Brasil con 2n = 4 y una población con dos números cromosómicos, 2n = 4 y 2n = 8. Estos autores sugieren que la raza cromosómica con 2n = 8 habría surgido por autoploidía a partir de la raza de 4 cromosomas siendo incierto el origen de esta última (Vanzela *et al.*, 1996). El 2n = 4 encontrado en poblaciones brasileras de *R. tenuis* es el número cromosómico más bajo observado en plantas con cromosomas holocéntricos (Vanzela *et al.*, 1996). La ocurrencia de fisiones y fusiones (agmatoploidía y simploidía) en la familia, dificulta la determinación del número cromosómico básico. Sin embargo, la existencia de muchos géneros y especies con números cromosómicos múltiplos de cinco permiten inferir que el número básico ancestral sería x = 5. Los números básicos x = 2, 4, 6, 9 y 12 serían secundarios (ver revisión en Luceño *et al.*, 1998). El número cromosómico 2n = 18 hallado en las poblaciones de la provincia de Corrientes (Tabla 1) podría haberse originado por poliploidía a partir de anteriores con x = 5 (2n = 10) y posterior fusión originando 2n = 18.

Ninguno de los taxones de *Rhynchospora* estudiados mostraron, en prometafase, evidencias de la existencia de una constricción primaria, asimismo en metafase los cromosomas parecen orientarse con su eje mayor perpendicular a las fibras del huso (Fig. 1 F) migrando en anafase paralelos al plano ecuatorial (Fig. 1 G). Estas evidencias sugieren que estas especies poseen cromosomas holocéntricos como señalaron Vanzela *et al.* (1996) y Luceño *et al.* (

1998) para otras especies de *Rhynchospora*.

Pleurostachys está distribuido en Sudamérica tropical y no se han hallado antecedentes citológicos en la bibliografía. *Pleurostachys densefoliata* (Fig. 1 K) y *P. urvillei* (Fig. 1 N-P) presentaron 2n = 10 y *P. gaudichaudii* (Fig. 1 L-M) 2n = 16. Las tres especies analizadas presentan diferencias en la longitud cromosómica total (LCT) y en el índice de asimetría A₂, siendo *P. gaudichaudii* la que posee el cariotipo más asimétrico (Tabla 1).

En ninguna de las tres especies se observó constricción primaria en prometafase (Fig. 1 K-N). En *P. urvillei* se encontró que en metafase mitótica los cromosomas se orientan con su eje mayor perpendicular a las fibras del huso (Fig. 1 O) y en anafase las cromátidas hermanas migran paralelas al plano ecuatorial (Fig. 1 P). Estas características estarían indicando también que *Pleurostachys* presentaría cromosomas holocéntricos, como fuera observado para otros géneros de Cyperaceae (Heilborn, 1932; Greilhuber, 1995; Luceño & Castroviejo, 1991; Vanzela *et al.*, 1996; Luceño *et al.*, 1998; Dopchiz & Poggio, 1999).

Los resultados obtenidos hasta el presente en *Pleurostachys* y dada su afinidad con *Rhynchospora*, nos lleva a sugerir que x = 5 sería también el número básico ancestral de este género y que x = 8 sería un número básico derivado.

AGRADECIMIENTOS

Las autoras desean expresar su agradecimiento

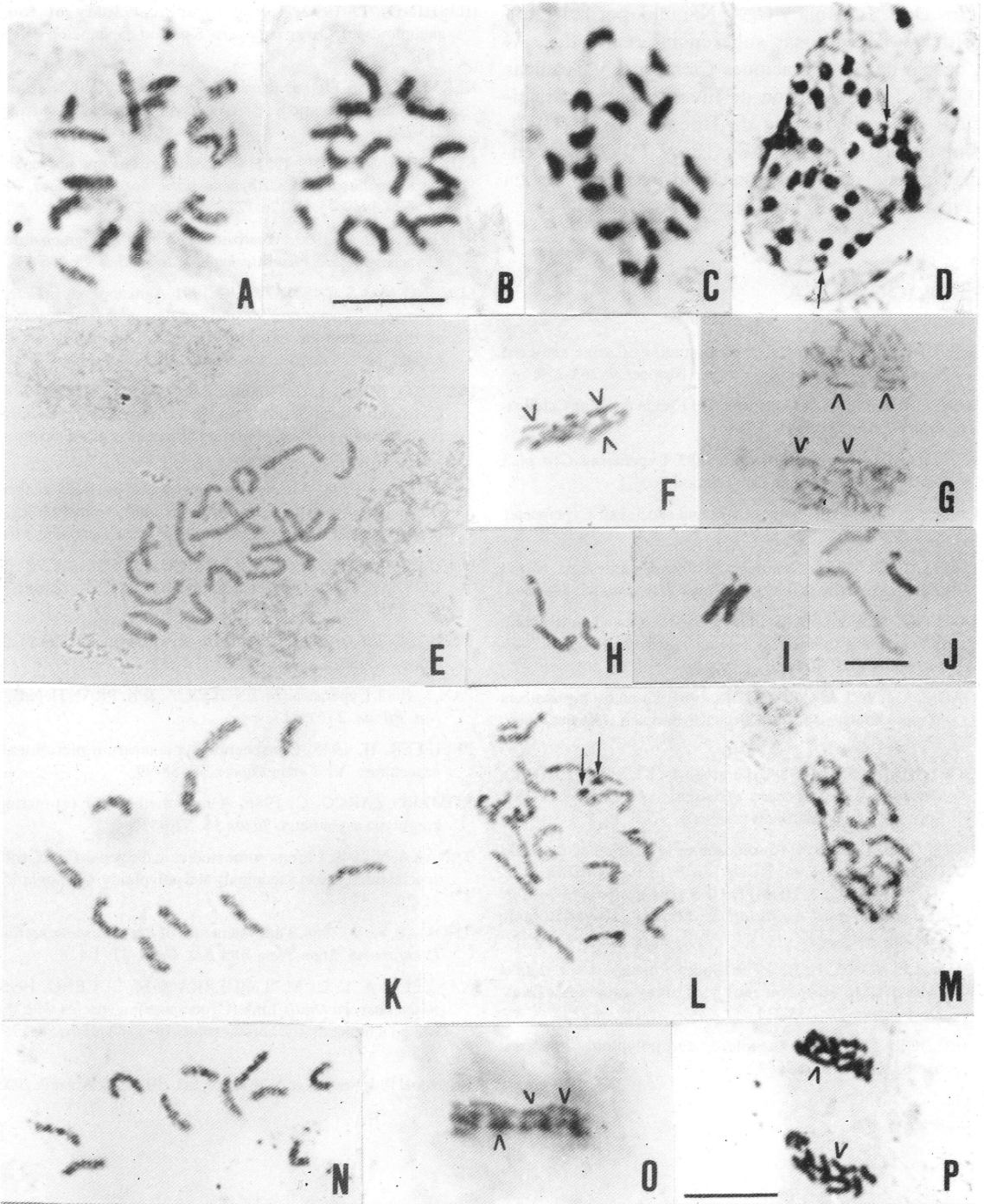


Fig. 1. A-J: Mitosis en *Rhynchospora*. A: *R. corymbosa* var. *asperula*, $2n = 18$. B: *R. corymbosa* var. *corymbosa*, $2n = 18$. C: *R. corymbosa* var. *organensis*, $2n = 18$. D: *R. marisculus*, $2n = 30$. Las flechas señalan cromosomas con satélites. E-J: *R. tenuis*. E: prometafase, $2n = 18$. F: metafase: las puntas de flechas señalan cromosomas orientados en forma paralela al plano ecuatorial. G: anafase. Las puntas de flechas señalan cromosomas migrando paralelos al plano ecuatorial. H-J: tipos de cromosomas con satélite observados. K-P: Mitosis en *Pleurostachys*. K: *P. desenfoliata*, $2n = 10$; L-M: *P. gaudichaudii*, $2n = 16$. Las flechas señalan satélites. N-P: *P. urvillei*, $2n = 10$; N: prometafase, $2n = 10$; O: anafase temprana. Las puntas de flechas señalan cromosomas orientados en forma paralela al plano ecuatorial; P: Anafase. Las flechas señalan cromosomas migrando paralelos al plano ecuatorial. A-D con igual aumento; E- J con igual aumento; K-P con igual aumento. Las barras representan $10 \mu\text{m}$.

a los Dres. L. Mola y C. A. Naranjo, por la lectura crítica y las valiosas sugerencias realizadas. Al Consejo de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET), Comisión de Investigaciones Científicas de la Provincia de Buenos Aires (CIC), Universidad de Buenos Aires (Proy. TWO1) y Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica (Proyecto 014443) por el apoyo económico.

BIBLIOGRAFÍA

- BAQUAR, S. R. 1978. Cytological studies of some southern Nigerian Cyperaceae. *Kromosomo* New ser. 9: 263-270.
- BARROS, M. 1960. Las Ciperáceas del Estado de Santa Catalina. *Sellowia* 12: 321-381.
- BENTHAM, G. & J. D. HOOKER. 1883. Cyperaceae. *Gen. pl.* 3 (2): 1060. L. Reeve and Co., London.
- CLARKE, C. B. 1908. New genera and species of Cyperaceae. *Kew Bull., Addit. Ser.* 8: 121.
- DAVIS, E. W. 1956. Cytology, evolution and origin of the aneuploidy series in the genus *Carex*. *Hereditas* 42: 349-365.
- DOPCHIZ, L. P. & L. POGGIO. 1999. Meiosis and pollen grain development in *Isolepis cernua* f. *cernua* (Cyperaceae). *Caryologia* 52: 197-201.
- GADELA, T. W. J. & K. KLIPHUIS. 1964. Chromosome numbers of some flowering plants collected in Surinam. *Acta Bot. Neerl.* 13: 432-433.
- GOETGHEBEUR, P. 1998. Cyperaceae. In: KUBITZKI, K. (ed.), *The families and genera of vascular plants* 4: 141-190. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg.
- GREILHUBER, J. 1995. Chromosomes of the Monocotyledons (General aspects). In: RUDALL, P. J., P. J. CRIBB, D. F. CUTLER & C. J. HUMPHRIES (eds.), *Monocotyledons: systematics and evolution* 2: 379-414. Royal Botanic Gardens, Kew, U.K.
- GUAGLIANONE, E. R. 1979. Sobre *Rhynchospora rugosa* (Vahl) Gale (Cyperaceae) y algunas especies afines. *Darwiniana* 22: 255-311.
- HEILBORN, O. 1932. Aneuploidy and polyploidy in *Carex*. *Svensk Bot. Tidskr.* 26: 137-146.
- HOSHINO, T. 1992. Cytogeographical study of four aneuploids of *Carex oxyandra* Kudo in Japan. *Bot. Mag.* 105: 639-648.
- KERN, J. H. 1958. Florae Malesianae Precursores, XVII. Notes on Malaysian and some S. E. Asian Cyperaceae. V. *Blumea* 9: 215-236.
- KÜKENTHAL, G. 1949-1951. Vorarbeiten zu einer monographie der Rhynchosporideae. *Rhynchospora. Bot. Jahrb. Syst.* 74: 375-509, 1949; 75: 90-126, 127-195, 1950; 273-314, 1951.
- KÜKENTHAL, G. 1952. Vorarbeiten zu einer Monographie der Rhynchosporideae. *Pleurostachys. Bot. Jahrb. Syst.* 75: 456-484.
- LUCENO, M. & S. CASTROVIEJO. 1991. Agmatoploidy in *Carex laevigata* (Cyperaceae). Fusion and fission of chromosomes as the mechanism of cytogenetic evolution in Iberian populations. *Plant Syst. Evol.* 177: 149-159.
- LUCENO, M., A. L. L. VANZELA & M. GUERRA 1998. Cytotaxonomic studies in Brazilian *Rhynchospora* (Cyperaceae), a genus exhibiting holocentric chromosomes. *Canad. J. Bot.* 76: 440-449.
- MOORE, G. 1998. The taxonomy of the horned-rushes (*Rhynchospora* section Longirostres Kunth). Annual Meeting of the Botanical Society of America 2-6 August. Baltimore, MD.
- NIJALINGAPPA, B. H. M., N. NAGARAJ & D. H. TEJAVATHI. 1978. In IOPB Chromosome number reports LXII. *Taxon* 27: 519-535
- NUÑEZ, O. 1968. An acetic haematoxylin squash method for small chromosomes. *Caryologia* 21: 115-119.
- PAX, F. 1887. Cyperaceae In: ENGLER, A. & K. PRANTL (eds.), *Nat. Pflfam.* 2 (2): 117.
- PFEIFFER, H. 1935. Conspectus Cyperacearum meridionali nascentium, VI. *Fedde Repert.* 38: 88-99.
- ROMERO ZARCO, C. 1986. A new method for estimating karyotype asymmetry. *Taxon* 35: 526-530.
- TANAKA, N. 1949. Chromosome studies in the genus *Carex*, with special reference to aneuploidy and polyploidy. *Cytologia* 15: 15-29.
- THOMAS, W. W. 1984. The systematics of *Rhynchospora* section *Dichromena*. *Mem. New York Bot. Gard.* 37: 1-116.
- VANZELA, A. L. L., M. S. GUERRA & M. LUCENO. 1996. *Rhynchospora tenuis* Link (Cyperaceae): a species with the lowest number of tric chromosomes (n=2) *Cytobios* 88: 219-228.

Recibido el 10 de Noviembre de 2000, aceptado el 01 de Diciembre de 2000.