

Estudio citogenético en *Karwinskia humboldtiana* (Rhamnaceae) del valle de Actopan, Hidalgo, México

FERNANDO TAPIA-PASTRANA *
PEDRO MERCADO-RUARO **
ANTONIETA LÓPEZ SÁNCHEZ *
SANDRA GÓMEZ ACEVEDO *

Resumen. Se realizó un estudio citogenético en células de meristemos radiculares de *Karwinskia humboldtiana* (Rhamnaceae) de diez individuos provenientes del valle de Actopan, Hidalgo, México (20°16'N y 98°56'O), empleando un método de extendido en superficie y secado al aire. Sobre un análisis de 443 núcleos se establece un número cromosómico diploide de $2n = 24$ con una muy baja frecuencia de núcleos tetraploides (1.8%). El complemento cromosómico de *K. humboldtiana* en esta población incluye sólo cromosomas metacéntricos y submetacéntricos cuyas magnitudes variaron gradualmente desde 0.88 μm hasta 1.49 μm con una longitud cromosómica total de 28.72 μm por núcleo. Se propone la fórmula cariotípica $8m + 4sm$, primera para una especie del género, cariotipo medianamente simétrico (T. F. = 40.0).

Palabras claves: *Karwinskia*, tullidora, número cromosómico, cariotipo.

Abstract. A cytogenetic analysis was performed using the chromosome splash technique in root cells of ten plants of *Karwinskia humboldtiana* (Rhamnaceae) from Actopan valley, State of Hidalgo, Mexico (20° 16' N and 98°56'O). Cytological data from 443 nuclei show a somatic chromosome number of $2n = 24$ with a low presence frequency in tetraploid nuclei (1.8%). The somatic complement of *K. humboldtiana* included only meta- and submetacentric chromosomes. The average chromosome length ranged from 0.88 to 1.49 μm and the absolute chromosomal length was 28.72 μm per nuclei. The mitotic karyotype established as $8m + 4sm$, reported for the first time for this genus, was fairly symmetrical (T.F. = 40.0).

Key words: *Karwinskia*, tullidora, chromosome number, karyotype.

* Laboratorio de Genecología, Facultad de Estudios Superiores-Zaragoza, UNAM. Apartado postal 9-020, 15000 México, D.F.

** Laboratorio de Fanerogamia, Departamento de Botánica, Instituto de Biología, UNAM. Apartado postal 70-233, 04510 México, D.F.

Introducción

Karwinskia (Rhamnaceae) es un género que agrupa unas 15 especies de árboles y arbustos cuyo hábitat natural se extiende del SE de los Estados Unidos de América al N de Colombia y las Antillas (Cuba, Haití y República Dominicana), siendo su centro de distribución la República Mexicana. En este país se encuentran 10 especies endémicas, consideradas en su mayoría tóxicas; algunas alcanzan una amplia distribución (Fernández, 1988, 1992). La mayor concentración de poblaciones se localiza en el norte y centro del país, existiendo agrupaciones importantes en San Luis Potosí y Querétaro, pero el número de individuos disminuye hacia el sur. Aunque el género frecuentemente se asocia a las zonas áridas puede encontrarse bien representado en bosques tropicales caducifolios, pastizales y en zonas ecotonales de encinares y matorrales xerófilos, desde el nivel del mar hasta los 2200 m snm. Las zonas templadas, semihúmedas y húmedas parecen ambientes poco propicios para el desarrollo de las especies de este género (Fernández, 1992).

Karwinskia humboldtiana (Roem & Schult) Zucc. (tullidora, capulincillo, coyotillo) es la especie que alcanza mayor distribución en México y por tanto es la de mayor tolerancia ecológica, encontrándose el grueso de sus poblaciones en las zonas áridas. Dentro de las especies del género, *K. humboldtiana* es la que ofrece mayor dificultad para delimitarla, ya que presenta polimorfismos en hojas, flores y frutos. La mayoría de los estudios sobre esta especie se han centrado en sus propiedades tóxicas (Padrón-Puyou, 1951; Kim y Camp, 1972; Bermúdez *et al.*, 1986), sin embargo para ésta y las demás especies del género no existe información citogenética necesaria para un mejor entendimiento de la evolución de la especie y de un tratamiento taxonómico más adecuado, particularmente si se considera que algunas especies incluyen poblaciones simpátricas, condición que podría favorecer la hibridación entre las especies, por lo que se ha señalado la necesidad de realizar estudios más profundos que permitan llegar a conclusiones certeras sobre esta compleja especie (Fernández, 1992).

El presente trabajo incluye un análisis cromosómico y una propuesta de cariotipo para una población de *K. humboldtiana*, revelando además características citológicas de interés para futuros estudios sobre las relaciones taxonómicas del género.

Materiales y métodos

Durante el mes de octubre de 1998, en el municipio de Santiago de Anaya, valle de Actopan (20°16'N y 98°56'O), en el estado de Hidalgo (Fig. 1), se colectaron semillas de *K. humboldtiana* provenientes de diez individuos de hábito arbustivo de no más de metro y medio de altura, ubicados en línea recta y separados entre sí por una distancia mínima de veinte metros.

Para la obtención de los cromosomas metafásicos se siguió el método propuesto por Tapia-Pastrana y Mercado-Ruaro (2001) para la obtención de cromosomas

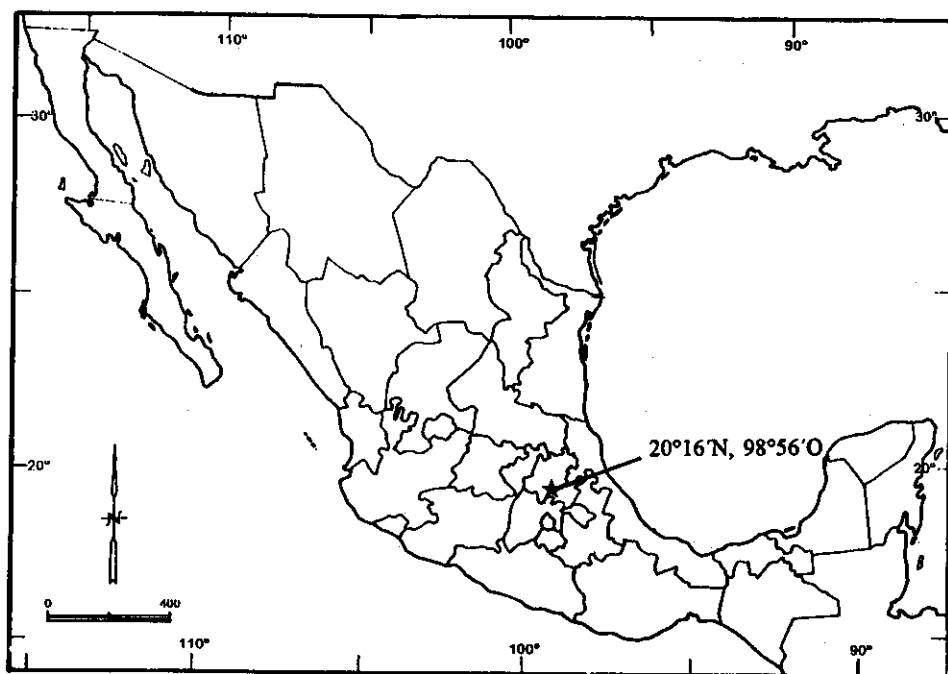


Fig. 1. Mapa de ubicación de la población estudiada.

vegetales. Treinta meristemos apicales provenientes de semillas germinadas a temperatura ambiente y en luz natural fueron separados de raíces de 1-2 cm de longitud y pretratados en 8-hidroxiquinoleína 0.002 M durante 5 horas a temperatura ambiente y fijadas en solución Farmer (etanol: ácido acético, 3:1) al menos durante 24 horas. Posteriormente, los meristemos fueron macerados en una mezcla de pectinasa 20% y celulasa 2% durante 2 horas a 37° C. El botón celular fue entonces separado por centrifugación (1500 rpm) durante 10 minutos y luego transferido a solución de KCl 0.075 M durante 20 minutos a 37° C, experimentando después dos lavados sucesivos en KCl 0.075 M. El botón fue fijado nuevamente en solución Farmer fresca y lavado dos veces más. Dos o tres gotas del botón fueron colocadas sobre laminillas previamente desengrasadas dejándose secar al aire. La tinción se realizó empleando solución Giemsa 10%. Las preparaciones se hicieron permanentes empleando resina sintética. Los mejores campos fueron fotografiados en un microscopio óptico Carl Zeiss Axioskop usando película Kodak Technical Pan. Para el establecimiento de las medidas cromosómicas, identificación morfológica de los cromosomas así como la obtención del cariotipo de *K. humboldtiana* se utilizaron las mejores 4 placas metafásicas y se aplicó el sistema propuesto por Levan *et al.* (1964) basado en la relación de brazos para localizar la posición del centrómero. La proporción de la suma total de longitudes de brazos cortos respecto a la suma

total de longitudes cromosómicas (T.F. %) como indicador de la simetría o asimetría de un cariotipo se realizó según Sinha y Roy (1979). La medición de los cromosomas se realizó sobre fotografías con la misma amplificación utilizando un vernier digital (Mitutoyo Digimatic Caliber CD-G[®] BS).

Resultados

La aplicación de una técnica de extendido en superficie y secado al aire como una alternativa al método tradicional de aplastado o *squash* permitió la liberación de los protoplastos y en consecuencia la separación óptima de los cromosomas al interior de los núcleos de *Karwinskia humboldtiana*, de tal manera que el conteo cromosómico se realizó sin dificultad en los núcleos analizados. Asimismo la morfología de los cromosomas, no obstante su muy pequeño tamaño, pudo apreciarse a partir de los mejores campos obtenidos.

Respecto a las características del complemento cromosómico, con excepción de ocho núcleos tetraploides (1.8%) de un total de 443 núcleos revisados, se determinó un $2n=24$ como número cromosómico somático para *K. humboldtiana*; en el mismo se presentaron cromosomas metacéntricos y submetacéntricos muy pequeños que variaron gradualmente desde 0.88 μm hasta 1.49 μm con una longitud cromosómica total de 28.72 μm por núcleo. En las mejores placas metafásicas fue posible observar un par de cromosomas con una extensa constricción secundaria y porción satélite (Fig. 2a y b).

El cariotipo e idiograma de *K. humboldtiana* para la población bajo estudio se muestran en la figura 3a y b constituidos de 8 pares de cromosomas metacéntricos (m) y 4 pares de cromosomas submetacéntricos (sm) y donde el par más pequeño (sm) porta la constricción secundaria y su correspondiente porción satélite (figuras 2a y b). Así, $8m + 4sm$ representa la primera propuesta de fórmula cariotípica para una población de *K. humboldtiana* y la primera para una especie del género. Para la elaboración del idiograma correspondiente se utilizaron los datos de las magnitudes cromosómicas promedio que se resumen en Cuadro 1. Por otra parte, el valor de la TF % (40.0) indica que el cariotipo es de naturaleza medianamente simétrica.

Discusión y conclusiones

En estudios concernientes con la evolución y sistemática, el conocimiento acerca de los cromosomas de las especies relacionadas es frecuentemente de gran interés y significado (Jackson, 1971; Grant, 1976; Kenton, 1986; Bennett, 1987). El principal objetivo de la clasificación morfológica de los cromosomas es alcanzar un entendimiento de cómo ha procedido la evolución cariotípica y encontrar correla-

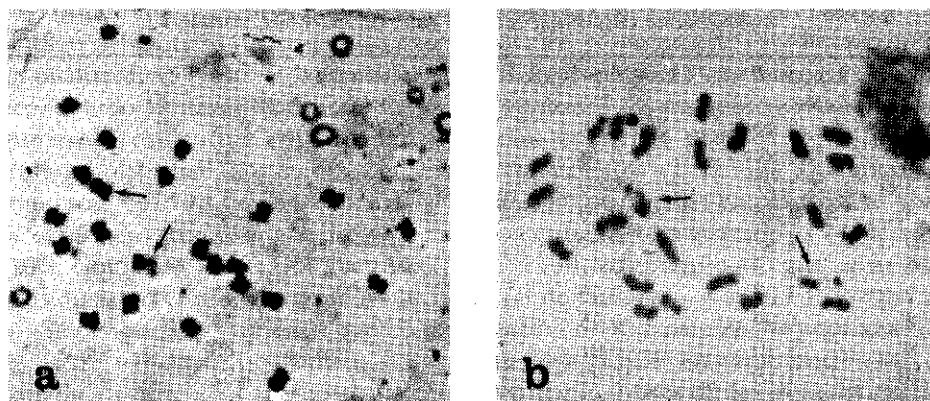


Fig. 2a y b. Núcleos metafásicos de *Karwinskia humboldtiana* $2n=24$, obtenidos mediante extendido y secado al aire. Las flechas señalan los cromosomas que portan satélite. Barra= 10 μ m.

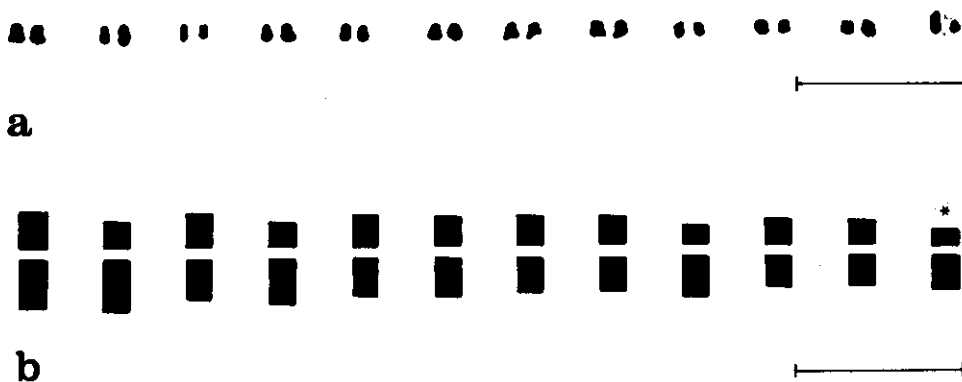


Fig. 3. a) Cariotipo de *Karwinskia humboldtiana*. Barra = 10 μ m. b) Idiograma de *K. humboldtiana*. Barra= 3 μ m. Para los tamaños cromosómicos absolutos e índice centromérico (véase cuadro 1).

Cuadro 1. Magnitudes cromosómicas somáticas promedio (μm) en *Karwinskia humboldtiana* (Rhamnaceae) del valle de Actopan, Hidalgo

N	Longitud total	Longitud brazo L	Longitud brazo C	r	Nomenclatura
1	1.49	0.86	0.62	1.38	m
2	1.35	0.73	0.60	1.21	m
3	1.27	0.69	0.57	1.21	m
4	1.23	0.70	0.52	1.34	m
5	1.17	0.62	0.53	1.16	m
6	1.13	0.61	0.51	1.19	m
7	1.07	0.58	0.48	1.20	m
8	0.99	0.55	0.44	1.25	m
9	1.40	0.91	0.48	1.89	sm
10	1.28	0.82	0.45	1.82	sm
11	1.10	0.72	0.38	1.89	sm
12	0.88	0.62	0.24	2.58	sm*

Obtenido de cuatro núcleos metafásicos y empleando una técnica de extendido y secado al aire.

N= Números de cromosomas

r= Proporción de brazos, según Levan *et al.*, 1964.

L= Largo

C= Corto

ciones con la evolución de otros caracteres, tales como los anatómicos y bioquímicos (Levan *et al.*, 1964). En el caso del género *Karwinskia*, existen trabajos sobre la química y toxicología de algunos de sus miembros, principalmente en *K. humboldtiana*, donde se ha determinado la estructura de algunos compuestos y que demuestran diferencias en el contenido de los mismos entre las diferentes especies (Waksman *et al.*, 1989). Sin embargo, es notable la ausencia de estudios citogenéticos, mismos que son de gran utilidad en el esclarecimiento de afinidades específicas o bien para delimitar especies (Kenton *et al.*, 1986; Grant, 1987). En efecto, la posibilidad de contar con estudios cariológicos en especies vegetales que como en el caso de *K. humboldtiana* tienen una amplia distribución geográfica y ecológica y poblaciones con notables diferencias morfológicas (Fernández, com. pers.), o bien, donde se sospecha la existencia de evolución paralela, amplía el panorama sobre el sistema genético, adicionando datos que contribuirán de esta manera a un conocimiento más integral de la misma en la perspectiva de realizar un manejo taxonómico más satisfactorio.

Por otro lado, una de las dificultades que enfrenta el análisis citogenético es que muchas especies presentan cromosomas pequeños y numerosos, resultando difíciles para un estudio detallado. Las técnicas convencionales de aplastado o *squash* muchas veces no resuelven lo anterior y quizá esto explicaría la ausencia de estudios citogenéticos en el género *Karwinskia*, pues en ensayos previos empleando la técnica de aplastado para el estudio cromosómico en *K. humboldtiana* (datos no mostrados) los resultados fueron poco favorables, ya que observamos cromosomas

de talla muy pequeña con una fuerte tendencia a agruparse en el centro del núcleo y en donde fue imposible establecer la morfología cromosómica. Sin embargo, el empleo del método de extendido y secado al aire, como en este estudio, permitió un análisis minucioso de las características del complemento cromosómico somático, debido al elevado número de núcleos revisados. Es conveniente señalar que nuestros resultados concuerdan bien con registros previos de números cromosómicos hallados en otros géneros pertenecientes a la familia Rhamnaceae, como son los casos de *Condalia*, *Ceanothus*, *Rhamnus* y *Hovenia* entre otros, en donde el número cromosómico diploide más frecuentemente registrado es 24 (Moore, 1973; Goldblatt, 1981; Goldblatt y Johnson, 1990), sugiriendo así que existe una constancia en el número cromosómico a nivel de familia.

Se debe señalar también que en la población de *K. humboldtiana* aquí analizada, la frecuencia de polisomatía fue bastante baja (1.8 %) en comparación con la hallada en otras leñosas, particularmente en leguminosas de los géneros *Acacia*, *Mimosa* y *Prosopis* de la misma localidad (Gómez, 2000; Tapia-Pastrana y Mercado-Ruaro, 2001 y datos no publicados) donde la cifra fluctúa entre 11 y 27 %. Este dato se deberá comparar en futuros estudios intra- e interespecíficos y en estudios ecogeográficos, lo que ayudaría al esclarecimiento de alguna tendencia adaptativa-evolutiva dentro del género *Karwinskia*.

Finalmente, con la determinación del número cromosómico somático y la propuesta cariotípica para *K. humboldtiana* registrados en este trabajo, inicia una serie de estudios que incluirán diversas especies del género presentes en nuestro país, ampliando la comprensión sobre la distribución y evolución de las mismas, ya que el entendimiento de la estructura cromosómica y su organización es importante en los estudios filogenéticos y taxonómicos (Coates, 1995; Bukhari, 1997; Tapia *et al.*, 1999).

Agradecimientos. Los autores agradecen a los Drs. Rafael Fernández Nava y Alfonso Delgado Salinas por la revisión crítica del manuscrito. Asimismo a la Biól. Carmen Loyola, las fotografías del cariotipo e idiograma aquí presentados.

Literatura citada

- BERMÚDEZ, M.V., D. GONZÁLEZ-SPENCER, M. GUERRERO, N. WAKSMAN y Y. A. PIÑEYRO. 1986. Experimental intoxication with fruit and purified toxins of buckthorn (*Karwinskia humboldtiana*). *Toxicon* 24: 1091-1097.
- BENNETT, M.D. 1987. Variation in genomic form in plants and its ecological implications. *New Phytologist* 106 (Suppl.): 177 - 200.
- BUKHARI, Y.M. 1997. Cytoevolution of taxa in *Acacia* and *Prosopis* (Mimosaceae). *Australian Journal of Botany* 45: 879 - 891.
- COATES, D.J. 1995. Chromosome re-patterning, genetic diversity and defining conservation units in Western Australian triggerplants (*Stylidium*). In: P. E. Branham y M. D. Bennett (eds.) *Kew chromosome conference IV*, Royal Botanic Gardens, Kew, pp. 9 - 20.

- FERNÁNDEZ NAVA, R. 1988. Tres especies nuevas de *Karwinskia* (Rhamnaceae) de México. *Acta Botanica Mexicana* 2: 11-20.
- FERNÁNDEZ NAVA, R. 1992. Nombres comunes, usos y distribución geográfica del género *Karwinskia* (Rhamnaceae) en México. *Anales del Instituto de Biología, Universidad Nacional Autónoma de México, Serie Botánica* 63(1): 1-23.
- FERNÁNDEZ NAVA, R. Y N. WAKSMAN. 1992. Una especie nueva de *Karwinskia* (Rhamnaceae) de Tehuacán, Puebla, México. *Phytologia* 73: 435-438.
- GOLDBLATT, P. 1981. Index to plant chromosome numbers 1975-1978. *Monographs in Systematic Botany* 5: 437-438.
- GOLDBLATT, P. Y D.E. JOHNSON. 1990. Index to plant chromosome numbers 1986-1987. *Monographs in Systematic Botany* 30: 166.
- GÓMEZ A., S. L. 2000. Estudio genecológico en *Prosopis laevigata* (mezquite), *Acacia farnesiana* y *Acacia schaffneri* (huizaches) de los municipios de Bermejillo, Dgo. y Santiago de Anaya, Hgo. Tesis. Facultad de Estudios Superiores-Zaragoza, UNAM, México, D.F. 75 p.
- GRANT, W.F. 1976. The evolution of karyotype and polyploidy in arboreal plants. *Taxon* 25: 75-84.
- GRANT, W.F. 1987. Genome differentiation in higher plants, In: K. M. Urbanska (ed.) *Differentiation patterns in higher plants*. Academic, London, pp. 9-32.
- JACKSON, R.C. 1971. The karyotype in systematics. *Annual Review of Ecology and Systematics* 2: 327-367.
- KENTON, A.Y. 1986. Importancia de los cromosomas en la especiación y evolución como base para el conocimiento y caracterización de especies vegetales con valor potencial. In: G. Palomino H. (ed.) III Seminario Maximino Martínez. 1986. *La aplicación de la citogenética en el conocimiento biológico de los recursos vegetales en México*. Jardín Botánico, Universidad Nacional Autónoma de México, México, pp. 11-36.
- KENTON, A.Y., P. J. RUDALL Y A.R. JOHNSON. 1986. Genome size variation in *Sisyrinchium* L. (Iridaceae) and its relationship to phenotype and habitat. *Botanical Gazette (Crawfordsville)* 147: 342-354.
- KIM, H.L. Y B.J. CAMP. 1972. Isolation of a neurotoxic substance from *Karwinskia humboldtiana* Zucc. (Rhamnaceae). *Toxicom* 10: 83-89.
- LEVAN, A., K. FREDGA Y A.A. SANDBERG. 1964. Nomenclature for centromeric position on chromosomes. *Hereditas* 52: 201-219.
- MEHRA, P.N. 1972. Cytogenetical evolution of hardwoods. *The Nucleus* 15: 64-83.
- MOORE, R.J. 1973. *Index to plant chromosome number 1907-1971*. International Bureau for Plant Taxonomy and Nomenclature, Utrecht, p. 267.
- PADRÓN-PUYOU, F. 1951. Estudio clínico-experimental de la parálisis por *Karwinskia humboldtiana* ("tullidora") en niños. *Gaceta Médica de México* 81: 299-305.
- RZEDOWSKI, J. 1985. *Flora fanerogámica del Valle de México. II. Dicotiledóneas*. Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, Instituto Politécnico Nacional e Instituto de Ecología, A. C. México. 519 p.
- SÁNCHEZ S., O. 1979. *La flora del Valle de México*, quinta edición. Herrero, México, pp. 46-48.
- SINHA, S.S.N. Y H. ROY. 1979. Cytological studies in the genus *Phaseolus* I. Mitotic analysis in fourteen species. *Cytologia* 44: 191-199.
- TAPIA-PASTRANA, F., P. MERCADO-RUARO Y A. MONROY A. 1999. Cambios en la longitud cromosómica total en tres poblaciones de *Prosopis laevigata* (Fabaceae). Implicaciones genecológicas y evolutivas. *Anales del Instituto de Biología Universidad Nacional Autónoma de México, Serie Botánica* 70 (1): 13 - 28.

- TAPIA-PASTRANA, F. Y P. MERCADO-RUARO. 2001. A combination of the "squash" and "splash" techniques to obtain the karyotype and assess meiotic behavior of *Prosopis laevigata* L. (Fabaceae: Mimosoideae). *Cytologia* 66 (1): 11-17.
- WAKSMAN, N., L. MARTÍNEZ Y R. FERNÁNDEZ. 1989. Chemical and toxicological screening in genus *Karwinskia*. *Revista Latinoamericana de Química* 20 (1): 27-29.

Recibido: 22-06-2001

Aceptar: 01-03-2002